

生命科学实验指南系列



现代生物化学与分子生物学仪器与设备

雷东锋 编著



科学出版社

(Q-1617.31)

生命科学实验指南系列·典藏版



图解微生物实验指南
精编人类遗传学实验指南
免疫学技术及其应用
单分子技术实验指南
生物衰老：研究方法与实验方案
现代蛋白质工程实验指南
精编细胞生物学实验指南
活细胞成像（原书第二版）
植物蛋白质组学实验指南
遗传变异分析实验指南
蛋白质纯化指南（原书第二版）
表皮细胞实验指南
环境基因组学实验指南
分子克隆实验指南（原书第三版）（上下册）
实验动物血液生理生化参考手册
精编分子生物学实验指南（原书第五版）
生理学实验指南
现代神经科学研究技术
精编免疫学实验指南
生命科学实验设计指南
酵母遗传学方法实验指南
现代生物化学与分子生物学仪器与设备
人干细胞培养
分子细胞遗传学——技术和应用
抗体制备及使用实验指南
精编蛋白质科学实验指南
病毒的电子显微学研究
实验细胞资源的描述标准与管理规范
植物生物学与生态学实验
实验动物设施运行管理指南
神经生物学实验原理与技术
元基因组学：方法和步骤（影印版）
DNA微阵列实验指南
现代工业微生物学实验技术
基因转移：DNA和RNA的转运与表达
真核生物转录调控——概念策略与技术（原书第二版）
生物实验室管理手册（原书第二版）
动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南（原书第六版）



科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn
销售分类建议：分子生物技术



赛拉艾芙
生命科学订阅号

www.sciencep.com



定价（全套）：4500.00元

生命科学实验指南系列·典藏版

现代生物化学与分子生物学仪器与设备

雷东锋 编著

西安交通大学学术专著出版基金资助
西安交通大学博士后课题经费资助
西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室资助项目

科学出版社
北京

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

图书在版编目（CIP）数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016

ISBN 978-7-03-047486-5

Ⅰ.①生… Ⅱ.①雷… Ⅲ. ①生命科学-实验-指南 Ⅳ.①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦

责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

http://www.sciencep.com

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2

字数：31 074 000

定价：4500.00 元

序　言

生物技术近年来突飞猛进的发展，在医药、农林等领域中已经得到了许多应用。现代生物学已经解决了所谓传统生物学和生物化学以前不能解决的问题。新的检验和研究的手段不断出现，也在推动各个和生物体有关学科的研究。

新的检测方法和仪器日新月异地在市场上出现，现在医院和农林研究机构的实验室和十多年前的生化实验室相比都给人面目全非的感觉。正是这些现代化的仪器和设备，推进了生物学科的发展，也在挑战仪器研制机构的创造性。

门类众多的各种仪器设备，所用的工作原理多种多样，方法的改进层出不穷。不出几年就有更新、更方便使用的新机型面市。

目前尚没有一本能涵盖众多品种的参考书来满足培训实验室工作人员的需要。更没有能供已在岗位上的实验室人员的自学进修的学习材料，以使他们能跟上学科高速发展的步伐。

我所知道的雷东锋博士，在他攻读本校博士学位以前，曾在一些实验仪器的制造厂中工作，收集了很多仪器的技术资料。因此他不但能熟练地使用这些设备进行研究，而且对其工作原理和维护也有较好的认识。在谈话之间我曾鼓励他写作一本书以帮助广大的实验室工作者，了解各种仪器的工作原理和维护知识，以便他们能更好地掌握新的技术，紧跟时代。

在雷东锋获得博士学位以后，在他的博士后工作期间，完成了本书的写作。因此，我乐于向读者推荐此书。

本书基本上囊括了一个现代生物化学和分子生物学实验室的所有仪器设备，从简单的 pH 计到最新最复杂的一些谱仪。在计算技术和电子技术已深入并整合到各种仪器的内部时，本书尚能简单地阐明了它们的工作原理，这是不容易做到的，有助于读者能在有更新的改进型号出现时，能跟上它的脉络。

本书的特点还在于，不仅阐明了各种仪器的工作原理，还按照常见的国内外产品型号介绍了它们的保养和维修的基本知识。这对实验室工作者提高工作效率，减少成本消耗也是很有用的。

当然这样一本希望包罗万象的参考书也仅是一个尝试，书中难免有错漏之处，还望各位看到此书的专家，不吝指出，以便以后能有改进，这也是作者的希望。总的说，希望这本书能对广大的实验室工作者有所帮助。

蒋大宗

2005 年 8 月

于西安交通大学

前　　言

编写本书的想法始于10年前，当时我接触了国内外众多的生物学实验室、化学实验室，甚至环保、电力、自来水、石化方面的检测实验室。我发现，尤其是在我国，国家花费了大量的经费（有些是贷款）购买了许多国际先进的实验仪器和设备，但是它们作用的发挥却十分有限，当然有众多的原因，比如说科研水平与仪器配置的先进性不符、配套设施和耗材准备不足，其中最重要的原因之一是仪器使用者和科研人员对仪器设备的组成结构、使用和维护以及实验室管理的知识比较缺乏，造成了设备与仪器太多的闲置、浪费甚至报废。处于这种考虑，我把这种想法告诉给我的两位导师——生物医学工程的著名科学家西安交通大学蒋大宗教授和西安交通大学免疫与病理专家王一理教授。他们鼓励并指导我将多年积累的材料进行整理，力图让读者在这些方面有所收获，于是编写了这本拙著，因此我由衷地再次感谢我的两位恩师。

在材料的整理和收集过程中，西安交通大学生命科学与技术学院的祝蒙蒙硕士、冯怡硕士、吴明宇硕士做了大量的工作，对他们的鼎力协助一并表示由衷感谢。此外我还要感谢西安天隆科技有限公司彭年才博士为我提供了PCR方面的一些宝贵资料。

在本书编写过程中，烟草行业从事烟气分析的一些专家给我提出了很好的建议，如陕西中烟工业公司龚朝凯总经理、高峰副总经理、陈晖副总经理以及汉中卷烟二厂席耀鹏厂长等，本书的一些仪器设备也可供烟草行业烟气和相关化学成分检测的人员参考，在此感谢他们的指导。

西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室
雷东锋
2005年11月12日

目　　录

第六篇　生物大分子制备系统及附属设备

第七篇　分离分析系统

第一篇　称量、洗涤和消毒设备

进行生物化学与分子生物学实验，首先要确保配制的各种溶液和缓冲液浓度的准确性，因此对于所使用各种试剂称量的准确度具有较高的要求。在实验室中，最常用的称量设备就是电子天平，它可以满足各种不同的称量要求。

生物实验室中经常进行的微生物培养与实验会使生物实验室内含有大量的微生物，其中的病原微生物可以通过皮肤和呼吸道进入实验者体内而影响健康。在实验室内除了使用一些物理、化学、生物的消毒方法，如紫外线、有机化合物杀菌剂等，对实验室进行整体消毒外，还可以利用实验室内基本的洗涤和消毒仪器，来完成实验室和实验用具的消毒工作，维持实验室内一定的洁净度。超声波清洗仪是实验室最常用的清洗仪器，可用于显微镜、望远镜等光学系统及取样玻璃片的清洗，还可以对生物化学实验室的试管、试剂瓶、烧杯等容器进行清洗。另一种清洗仪器——洗板机，是用于酶标仪微孔板的专用清洗仪。

对于微生物培养、生物大分子提取过程中要求无菌的培养皿、离心管和试剂等，应用灭菌锅和自动灭菌器进行消毒是一项必备措施。本篇将详细介绍上述几种生物实验室使用的常规的洗涤和消毒设备。

第一章　电子天平

天平是生物化学与分子生物学实验中用于称量的最基本和最重要的设备之一，在实验室建设和实验进行的过程中应根据称量对象和称量精度的要求不同，选用合适的天平。例如，称量小型实验动物的体重可使用台秤，对固体试剂进行粗略称量可以使用架盘药物天平，更精确地称量可以使用扭力天平、光电分析天平等，此外还根据实验室研究项目的不同，本着经济、适用的原则，从数量和类型上进行合理搭配。一般来讲，实验室中天平的感量范围和精度都要涵盖一个较宽的范围。

目前有些较先进的电子天平都采用了现代传感器技术、电子技术和微型计算机等先进技术，结构虽简单，但功能较齐全，与机械天平相比，电子天平不仅克服了非等比性误差，还增加了校准、数字显示、自动去皮、自动故障寻迹、数据输出等功能。例如，在生物化学与分子生物学实验室中使用较为广泛的电磁力平衡式电子天平，不仅其最大称量范围可达数百到数千克，而且感量可以从 0.1mg 增至 100mg。这类电子天平种类繁多，各有特点，使用者可根据自己的需要进行选择。

第一节　简　介

一、分　类

目前市场上销售的国产或进口的电子天平，其种类多种多样，下面将分类进行介绍。

（一）应变式电子天平

应变式电子天平在受力可变形的弹性体上贴有组成桥路的应变片，并利用半导体电阻应变片作为敏感元件感应载荷质量的变化。这类电子天平结构简单，价格低廉，但精度不高，目前市售的商品，最高精度为 0.01g。一般商用的电子天平多为应变式电子天平。

（二）振弦式电子天平

物体的重力作用使振弦伸长或缩短，从而改变了振弦频率。当载荷增加时，振弦频率升高，以频率的变化来反映载荷质量的大小。

（三）音叉振动式电子天平

类似于振弦式，如日本石田衡器于 1988 年制成的 QB 系列音叉振动式电子天平。

（四）电容电感式电子天平

这类天平利用霍恩同轴差动电容作衡量元件制成天平。

（五）晶体振荡式电子天平

利用石英晶体的压频效应制成天平，其缺点是压力与频率之间呈非线性关系，使称量误差增大，且较难修正。

（六）电磁力平衡式电子天平

目前市售的用于高精度称量的电子天平，普遍为电磁力平衡式电子天平。用电磁力平衡原理制成的天平，精度高，可重复性好；其缺点是称量范围小，直接应用时只能称量小于 500g 的物质，但利用杠杆原理，称量上限可扩展至 1kg 以上。

在众多种类的电子天平中，使用最普遍、精度最高的是磁电式电子天平，将在下一节中重点进行介绍。



图 1-1　瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司（METTLER）的 UMX2 超微量天平

二、基本结构

电子天平的结构多样，电磁力平衡式电子天平最有代表性，其基本结构由托盘、磁铁、线圈、横梁、防护罩等组成（图 1-1）。

三、影响称量精度的因素

（一）预热时间

天平的充分预热是保证天平示值稳定的关键。电子天平的基本工作基础是平衡。一旦失衡，便会利用电磁力将天平重新拉回平衡状态。这个电磁力是由流经线圈中与物体质量成正比的电流在永久磁钢中产生的。电磁力 F 的大小与磁钢的磁通 Φ、流经线圈中的电流 I 及线圈长度 L 成正比。当天平处于预热阶段时，随着内部温度升高，Φ 会逐渐下降，同时 I 也会减小，这样就导致 F 变小，天平失去平衡，示值会呈现正的单方向漂移。只有经过充分预热，使磁钢达到热平衡，这一变化过程结束，天平才达到平衡。再利用归零/去皮功能，显示归零，此时天平方可使用。为了减少电子器件，如变压器、桥式整流器、三端直流稳压集成电路等发热器件的影响，新一代的电子天平已将主要发热器件——变压器移到天平的外部，成为一个独立部分以尽可能消除温度的影响。对于实际分度值为 1.0μg 或 0.1μg 的微量或超微量天平，都是将称量室与电子部分分成两个独立的部分，其目的是为了减小热噪声对传感器的热影响，以利于更为稳定与准确地称量。另外，电子天平通常都没有类似家用电器的电源开关，只要给天平通电，即使显示器上无显示，天平也已处于预热状态。因此经常称量的天平不必拔掉电源，尤其是高准确度天平，在条件许可的情况下，可长期通电保持天平始终处于预热状态。

（二）预压

电子天平在停止工作一段时间后可能进入休眠状态，为使天平尽快进入工作状态，使用前最好用砝码多次加载，否则天平进程示值与回程示值之差将明显增大。加载时不必在意称量结果和归零情况。电子天平预热好以后，也不要立即进行称量，而要短暂地加载、卸载，以运动天平。电子天平的传感器通常是由 9 片或 11 片簧片构成的弹性支撑体，天平传感器就是利用这些簧片进行力的传递，使天平在平衡-失衡-再平衡的过程之中完成称量。然而，在天平处于通电预热阶段或较长时间停止称量时，天平传感器处于停止工作的休眠状态，当然簧片也处于休眠状态，其恢复性能不佳，若这时进行称量，势必会引起天平加载后归零不佳、示值稳定性不好、重复性差等问题。对于半微量、微量和超微量天平，必须进行预压，否则不易得到稳定的称量结果。

（三）读数时间

天平示值稳定与否，一般都有规定的符号在显示屏上指示。当示值稳定时，稳定指示灯（或符号）亮起，或不稳定灯（或符号）消失。稳定的范围一般都是分档可调，稳定范围的设置与显示屏上出现的稳定示值时间成反比。天平从加载到稳定实际上是一个振荡平衡的过程，当振荡波形的振幅逐渐减小，达到原先所设定的稳定范围时，显示屏上即显示出稳定的符号（或不稳定符号消失）。但实际上此时天平仍未完全稳定，还要再经过一段时间才能趋于稳定。这段时间的长短与原来天平所设定的稳定范围有关，也和天平的检定分度值有关。为此，一般不在稳定符号出现（或不稳定符号消失）后立即进行读数，而是顺延一定时间。每次读数顺延的时间应相对一致，即在天平稳定符号出现（或不稳定符号消失）后顺延一段固定的时间再进行读数。

（四）样品本身自然物理特性和变化造成的影响

1. 样品和容器的温度

当样品和容器的温度与天平称量室的温度不同时，存在一个温度差，此差异在称量容器外侧会导致产生沿不同方向流动的气流。此气流产生一个向上或向下的作用力，在这个动态空气浮力的作用下就会产生错误的称量结果。为了避免样品和容器的温度影响，在称量时，要保持样品同称量室温度相同后再进行称量，不要对从干燥器或冰箱里取出的样品直接进行称量；为避免手温对容器的影响，要使用镊子夹取容器；尤其要注意，尽可能避免手进入天平称量室，引起称量室温度升高，可使用长柄镊子夹取容器，或者使用长柄样品勺添加样品；在使用容器的形状上也要注意，应使用表面积较小的容器，以减少温度的影响。

2. 样品的吸湿性或挥发性

在称量一些具有吸湿性的样品时，天平显示值会缓慢增大；反之，称量一些具有挥发性的样品时，天平显示值会越来越小。这一现象还往往被一些使用者误解，以为是天

平自身漂移所致，其实不然。为了准确称量这类样品，首先要选择所用容器的形状和大小，例如，称量液体类样品，可选择加塞细颈瓶，从而减少样品的吸湿或挥发；称量固体或粉末类样品，则应给称量器皿加盖，隔绝样品对水分的吸收或挥发。为了减少样品吸湿性和挥发性的影响，应尽量减少称量时间，当天平称量过程刚结束，即指示称量过程的符号如小圆圈或小圆点一消失，立即记下天平显示值，以避免由于样品吸取水分或挥发水分而发生漂移。另外，要保持容器的清洁干燥以及天平称量盘的清洁干燥，不要粘有灰尘、污染物及水滴。

3. 样品和容器的静电现象

称量容器一旦带有静电，会导致天平示值长时间不稳定，无法稳定显示准确的称量结果，导致重复性降低。静电主要是由粉末状或颗粒状样品与这类绝缘容器摩擦而产生的，如果没有良好的泄放途径，这些静电就不能消除或者至少需要几小时才能缓慢地消除。为了消除样品和容器的静电，简单的办法是让三芯电源插座的接地端与地面有良好的接触，标准实验室尤其要注意，应该采用一根专门的接地线，埋入地面，然后将接地线引入电源插座的接地端。此外，还要注意选择不同材料的称量容器，尽量避免使用极易产生静电的塑料容器。玻璃容器在这方面的性能优于塑料容器，金属容器更好。

4. 磁性样品和容器磁化

称量被磁化的物体，由于磁性物体与不锈钢称量盘相互吸引，会产生多余的力被天平误以为是加载，影响称量的准确性，导致称量结果重复性差。这种称量现象很容易被发现，但用户往往忽视其产生的原因，或者误认为是天平自身重复性差的问题。解决这一影响的最基本思路是加大盛有样品的容器与称量盘之间的距离，减弱磁力的影响。最常用的办法是采用下挂秤盘，或者将样品放置在非磁性的支承物上，如高的玻璃量杯或铝、铜支架，从而加大样品与称量室内秤盘的距离。其他的方法还有，对样品和容器进行去磁，或者将样品放置在导磁良好的合金容器内，让其磁力线沿合金容器内壁形成自封闭，也可减少磁力的影响。

第二节　电磁力平衡式电子天平

一、工作原理

由于电磁力平衡式电子天平使用最为广泛，因此以该类电子天平为例，介绍电子天平的工作原理。电磁力平衡式电子天平的工作原理是基于通电导线在磁场中受到安培力的作用。当秤盘上放有被称量物体时，秤盘向下发生线性位移，触动电磁传感器，使原来处于平衡状态的两个光敏三极管在发光二极管的光量发生变化时产生电流，此电流经放大后反馈到磁铁内的线圈中，使受力增大，将秤盘托起，恢复至平衡位置。此时流经线圈的电流通过取样电阻时，产生电压降，电压值与被称量物体的质量成正比。电压信号经过放大、滤波等处理后，进行模/数转换。电流模拟信号转变成数字信号后，再经芯片处理，最终在显示器上显示出质量值。电磁力平衡式电子天平的输出信息处理示意

图如图 1-2 所示。上皿式电磁力平衡式电子天平的工作原理图如图 1-3 所示。

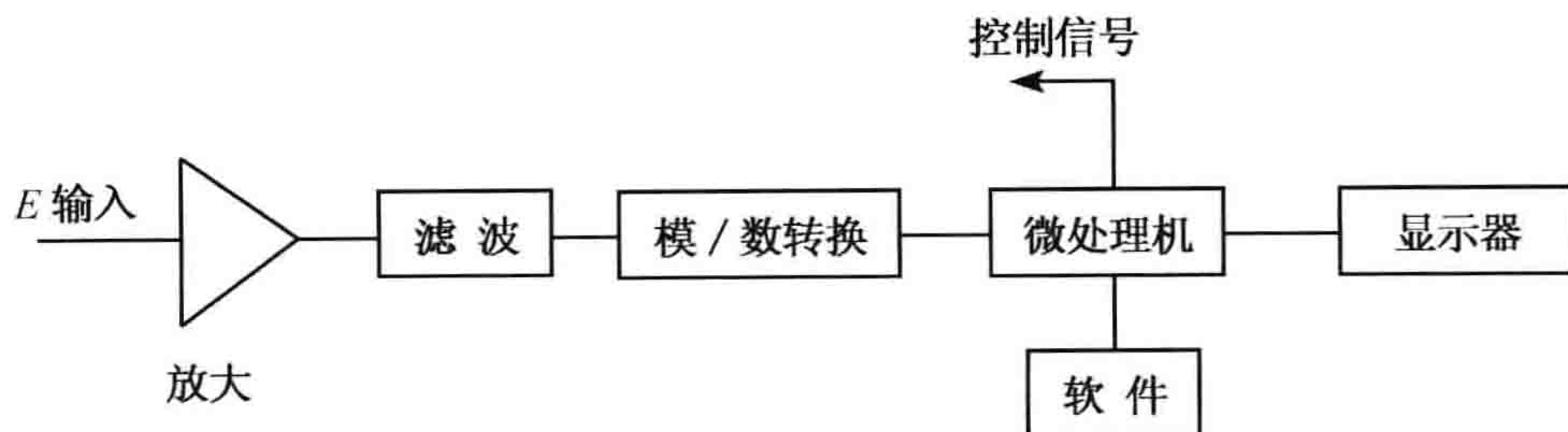


图 1-2　电磁力平衡式电子天平的输出信息处理示意图

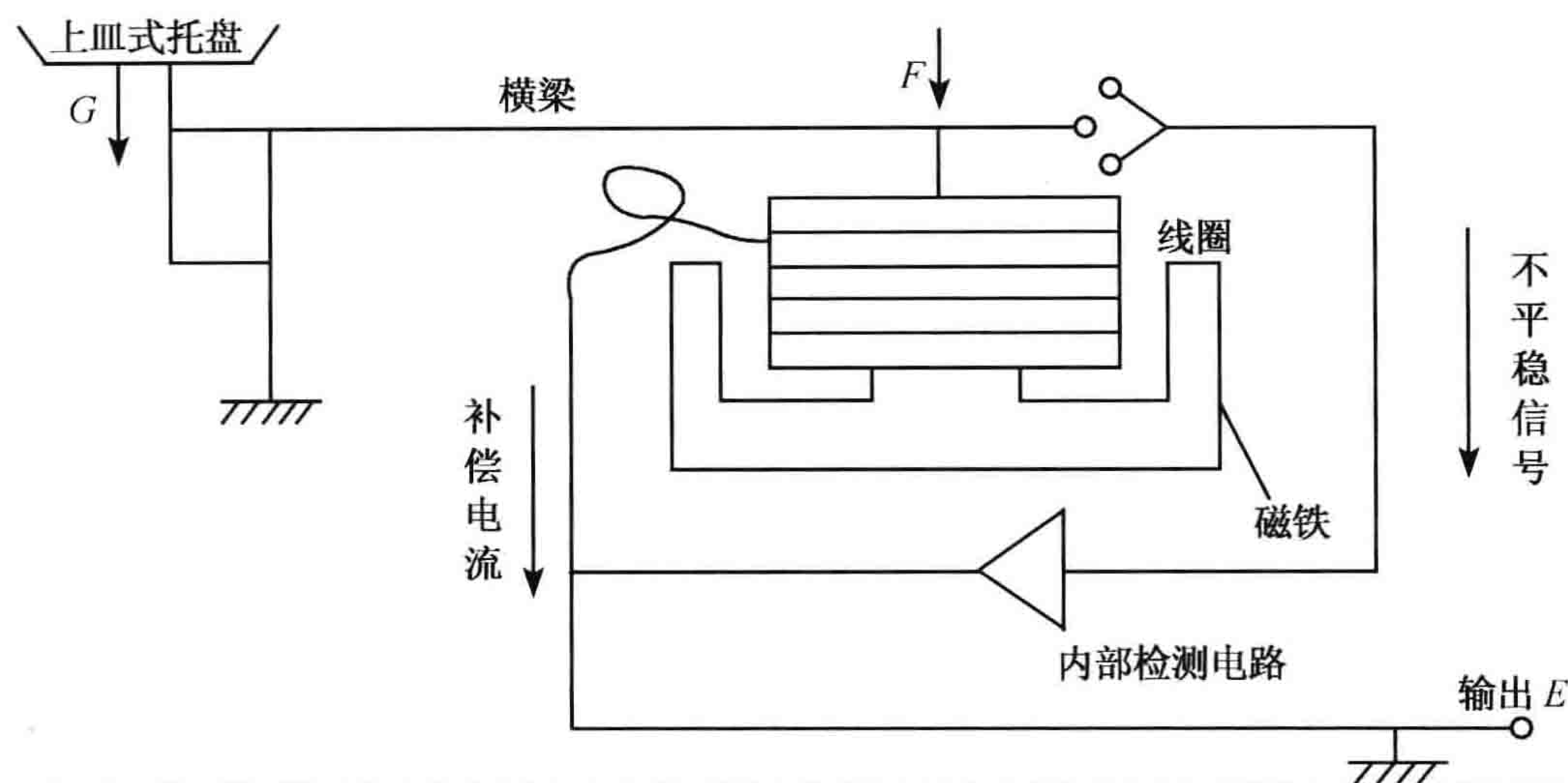


图 1-3　上皿式电磁力平衡式电子天平原理图
E：电压信号；G：所称量物体的重量；F：电磁力

二、两种系列电子天平的性能特点

（一）UMX2 超微量天平

该型号的电子天平为瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司（METTLER）的产品，其显著特点是：①称量精确度高可以达到 0.0001mg，可读性为 0.1μg，最大称量值为 2100mg。②设计科学：称量部件与显示部件分离，可避免元件发热对称量值的影响；触摸屏设计，显示屏为可调视角的背亮式显示屏。③操作方便：无需用手就可操作防风门、去皮与打印。④数据处理和操作智能化、网络化，具有 RS232C 通用接口，可使用计算机进行操作，操作软件可在网上更新。⑤保护功能齐全，称量具有过载保护功能。

（二）SE/ME 系列微量天平

该系列电子天平为德国 Sartorius 公司的产品，采用超高速称量系统，其显著特点是测量快速，只需 10s 便可取得精确的称量结果，而且称量值重复性好；智能化程度较高，具有全自动校准功能；内置 EUREKA 软件可对空气浮力进行修正，从而确保称量结果具有较高的准确度；采用全自动玻璃防风罩，操作简便，样品观察方便；通过内置数据接口，可以输出符合 GLP/GMP 标准的打印结果。

第三节　操作使用

一、注意事项

使用电子天平应注意以下几点：

1）在称量之前，特别是称量大量物质或连同容器一起称量时，一定要判断所称重总量是否在使用天平的称量范围之内，如超出称重范围，往往会引起天平故障。

2）对天平所显示数字及符号的意义应准确理解（参阅说明书），以免得到不可靠的称量结果。

3）精确度高的天平常会因环境空气流动而引起称量结果漂移，造成测定结果不稳定，有些型号的仪器带有调整功能，可缩短称量时间。

4）电子天平属精密仪器，应避免震动，减少移动。

5）称量结束后在取走称量物之前应先关闭电源。

6）天平周围及称量盘面应保持清洁。

二、一般操作步骤（以称量少量粉末试剂为例）

（一）安装注意事项

电子天平的安装正确与否，对能否正确称量有较大影响，因而必须正确安装，保证天平及各组部件正常工作。

1）电子天平安装的周围环境温度要求在10～30℃，温度变化率应小于1℃/h，空气相对湿度应小于85%。

2）电子天平周围要求没有风和影响稳定的气流存在，并且不存在震动源。

3）除地磁场外，无外磁场或其他干扰存在。

4）检查电子天平垫脚是否完好，将电子天平置于稳固的工作台上。

5）检查并安装好电子天平的秤盘和防风罩，将电子天平调整至水平状态。

（二）称量

1）将待称物放在已校好的电子天平上，电子天平即显示物体质量。

2）使用去皮功能时，可先将需要去皮的物品放在秤盘上，待读数稳定后，清零使电子天平显示值为0.00g，然后再将待称物放上秤盘，电子天平显示值为待称物品的质量，如还需去皮可以再次“清零”，电子天平可多次“清零”，但秤盘上总质量不得超过该天平所标的最大称量，否则显示值闪烁报警，在此情况下需将秤盘上的物品移去。

3）称量几个物品时，如将所有物品都放在秤盘上“清零”后再移开部分物品，此时电子天平显示值前出现“－”号，表示移去物品的质量。如需要得到秤盘中物品的总质量，则应将所有物品移去，电子天平显示值的绝对值即为物品的总质量。

4）测试两个或两个以上样品的差值时，可采用以下称量方法：先将标准样品放在秤盘中按“清零”使电子天平显示值为0.00g，然后移去标准样品，放上需与标准样品比较的试样，电子天平显示值为上述两个样品的差值。数值前“＋”号表示超过标准样

品的质量，“—”号表示比标准样品少的质量。

5）在使用过程中，要求待称物尽可能置于秤盘中央，且要轻拿轻放，以避免秤盘上质量突然增加或减少对传感器的影响，造成不必要的误差。

（三）操作步骤

1）用气泡水平仪检查天平是否处在水平状态。

2）接通电源。

3）用镊子取称量纸一张，对折，打开折纸，注意手不要接触对折纸的内面，内面向上平放在天平的称量台上。

4）按下归零键，使指示窗内数字为零。

5）轻轻叩打试剂瓶，使试剂徐徐倒入称量纸上（或用牛角匙取出试剂）。

6）试剂取出过量时，可取出，直到所需质量。注意去除掉的试剂应丢弃，不要放回到试剂瓶内。有危险或造成污染的试剂应按规定特殊处理。

7）关闭电源，用手轻持称量纸的一侧，将试剂移到烧杯或其他容器内。

8）清理称量台及天平周围桌面。

三、故障排除

一般较为先进的电子天平都具有故障寻迹功能，正常的电子天平开启稍后则显示零位 0.00g。精度不同，显示零位保留位数不同。另外，不同型号的电子天平都有一些故障代码，如 E1～E8、H、L 等来显示出现故障的类型，操作者可参考说明书有针对性地查找、分析和迅速排除故障。下面介绍电子天平一些常见故障的排除方法。

1. 天平显示 888…循环或开启天平后蜂鸣器常鸣

遇到上述两种情况时，应考虑 CPU 芯片出现故障，只有更换 CPU 才能解决。开机显示 888…后无显示，用万用表检查输出电压是否正常，若不正常可更换稳压块来解决。

2. 开启天平后，故障代码寻迹已过，但不显示零

该故障需要从两个方面进行检查：①检查校正砝码是否与传感器有接触，应打开天平外壳，检查内校砝码位置，重新安装砝码；②检查是否是秤盘与下部底板有摩擦现象导致天平不稳定，应检查下底沟是否相碰，进行处理。

3. 天平每次称量之后，示值不回零位

造成该故障可能的原因较多，需要逐一查验：①天平未能水平放置，调整天平水平器；②天平预热时间短，应预热 30min 以上；③天平需定期进行校正；④线性误差太大，超出了允许范围，应根据天平说明书进行线性调整。

4. 显示少一位

先进的电子天平多采用动态扫描显示数据，根据动态扫描显示的原理分析，可知是

数码管电源控制电路中有一处损坏。根据各个型号电子天平的电路图，检查组成电源控制的集成电路，用示波器测量每个输出脚是否有输出脉冲。如果没有，则需要更换该集成电路，即可排除故障。

5. 显示缺笔画

根据动态扫描显示的原理分析，可知是数码管笔画控制电路局部损坏而引起显示缺笔画。根据电子天平的电路原理图，察看笔画控制电路，用示波器测量其输出脚，若某个输出脚没有输出脉冲，则需要更换，即可排除故障。

6. 电池漏液后的处理

电池漏液后就会腐蚀印刷电路板。出现这种情况时，应更换电池，同时把被电解液腐蚀的印刷板清洗干净。可用断的钢锯条刮去污物，然后用乙醇反复清洗。清洗必须彻底，使印刷电路板的铜箔之间不再有短路现象。印刷电路板清洗干净后，再用导线把断掉的铜箔连接起来。在元件没有损坏的情况下，故障一般都能排除。

7. 每次开机时显示都闪烁

每次开机时显示都闪烁一般是仪器的灵敏度校正因子丢失导致的。大多数电子天平要求平时不使用时也始终接通电源（即始终插上电源插头），使蓄电池经常处于充足电的状态。如果平时不接通电源，而且使用的时间又很少，蓄电池大部分时间处于放电状态，很容易使蓄电池超过放电终止期，从而引起性能变坏，容量减小。每次开机时虽然校正了灵敏度，但因蓄电池的容量不足，到下次开机时灵敏度校正因子再次丢失，因而出现每次开机时显示都闪烁的故障。只要更换可充电电池，重新校正灵敏度，平时不使用时也经常接通电源，就不会再出现这种故障。

8. 按下皿开关时不发出声音

声音是由蜂鸣器发出的，先检查蜂鸣器是否损坏。该故障蜂鸣器损坏的情况较少，多数是驱动晶体管损坏引起的，只要更换晶体管即可排除故障。

四、维护保养

正确维护和保养对天平的使用寿命与称量结果的正确性作用很大。尤其是电子天平，组件精细，容易产生静电导致吸尘，其维护保养就更显重要。

1. 定期接通交流电源

如果电子天平不经常使用，也必须定期（每周或隔周）插上电源插头，接通交流电源，使电池充足电。否则电池容易过度放电而损坏。

2. 经常检查电池

必须定时打开后盖板，检查电池有否漏液。若发现电池有问题，就必须及时更换，

以免电解液腐蚀印刷板。

3. 防止被称重物突然落下

若被称重物突然落到秤盘上，容易引起横梁簧片断裂而无法修复，因此重物置于秤盘上时，应特别注意轻取轻放。

4. 其他

电子天平应放置在防潮、防震的环境，保证没有腐蚀性气体侵蚀，以防止元器件变质、机械紧固件震松、金属零件表面腐蚀等现象的产生。要经常检查机械紧固件是否松动。要注意保持天平清洁，可使用鹿皮等软织物擦洗，防止灰尘或其他杂物进入电子天平壳体。不要随意打开罩壳以免电子线路脱焊、短路从而影响电子天平的工作，甚至损坏元器件。使用前必须检查供电电源电压是否与电子天平所需电源相符，还应通电预热。电子天平要定期进行校正，如发现电子天平工作不正常，应立即停止使用，待检查修复后才能继续使用。

第四节　电子天平的应用与发展

电子天平的应用十分广泛，不仅用于生物化学与分子生物学领域，而且在大多数的生物学实验室，它都是必不可少的称量工具。天平除一般的称重外还可测定比重、含水量、颗粒大小及其分布、表面张力、微压、吸附率、蒸发率等。在专用热分析中，可作热重分析。在风调试验中，可测风力的大小。随着电子天平的功能不断增强，其应用也会不断扩大。

电子天平的发展趋势可以总结为向高精度、高效率、高抗干扰能力的方向发展。此外，还会有越来越多的外部设备和天平结合起来，天平、计算器、处理机和打印机都可能结合成为一个整体。目前已经出现了高精密度电子分析天平，这类电子分析天平是计算机技术和高精密度传感器技术相结合的产物，利用计算机堆栈存储方式，一次可连续存储 50 个试样的重量，并利用计算机对电子分析天平输出信号进行自动校正和显示，具有称量速度快、准确度高、去皮等功能，是现代生物化学与分子生物学实验室准确计量必不可少的设备。

主要参考文献

邓志军．1997．电子天平的原理与使用．理化检测-化学分册，33（5）：225～229
郭境．2003．电子天平检定结果差异原因分析．计量技术，（12）：50～55
黄迪纲．2001．高精密度电子分析天平原理及故障分析．钢管，30（1）：42～45
刘隽梅，傅冰．2002．影响电子天平准确性的两个因素．中国计量，（9）：43
马继成，吴帅民，陆申龙．1999．电子分析天平的工作原理及在实验中的应用．物理实验，20（5）：46～47
马联生．2001．电子天平常见故障及处理方法．工业计量，（14）：52

潘彪，王英．2003．电子天平的使用与维护．工业计量，(3)：57
沈朗然，莫善正．2000．2004 MP6 型电子天平的使用和维修．现代科学仪器，(6)：58
宋桂华．2001．天平的发展历史及概况．大众标准化，(3)：44
张维铭．2003．现代分子生物学实验手册．北京：科学出版社．9～11

第二章　超声波清洗仪

超声波清洗技术作为一种先进、高效的清洗技术，已经在国内外生物化学与分子生物学实验室中得到了广泛的应用。该技术不仅可以提高被清洗制件表面的洁净度，清洗速度快，工效高，大大降低清洗作业的劳动强度，而且可以对易碎物品或制件以及外形结构比较复杂，具有狭小缝隙、孔洞的制件（或部件）进行清洗，使得清洗工艺过程实现连续自动化。目前，超声波清洗仪已经成为生物学实验室中最普遍的清洗仪器。

第一节　简　　介

一、基本原理

超声波清洗的基本原理是基于超声在液体中的空化作用，当声压或声强达到一定值时，清洗液中的气泡迅速增长，然后突然闭合。在气泡闭合时，产生冲击波，在气泡周围产生 1012～1013Pa 的压力及局部高温，这种物理现象称为超声空化。由于超声清洗具有显著的清洗效果，因此可应用于一些清洗难度大且质量要求高的场合。

超声波清洗仪的基本原理如下：换能器将超声频电能转换成机械振动并通过清洗槽壁向盛在槽中的清洗液辐射超声波，存在于液体中的微气泡（称为空化核）在声波的作用下振动，并发生空化作用，空化所产生的巨大压力能破坏不溶性污物而使它们分散于溶液中。凡是液体能浸到、声场存在的地方都有清洗作用，而且清洗速度快、质量高，特别适用于清洗表面形状复杂的制件，如空穴、狭缝等的细致清洗，易于实现清洗自动化。在某些场合下可以用水代替有机溶剂或降低酸碱的浓度进行清洗，对于一些有损人体健康的清洗，如清洗放射性污物，可以实现遥控或自动化清洗。超声波清洗仪原理如图 2-1 所示。

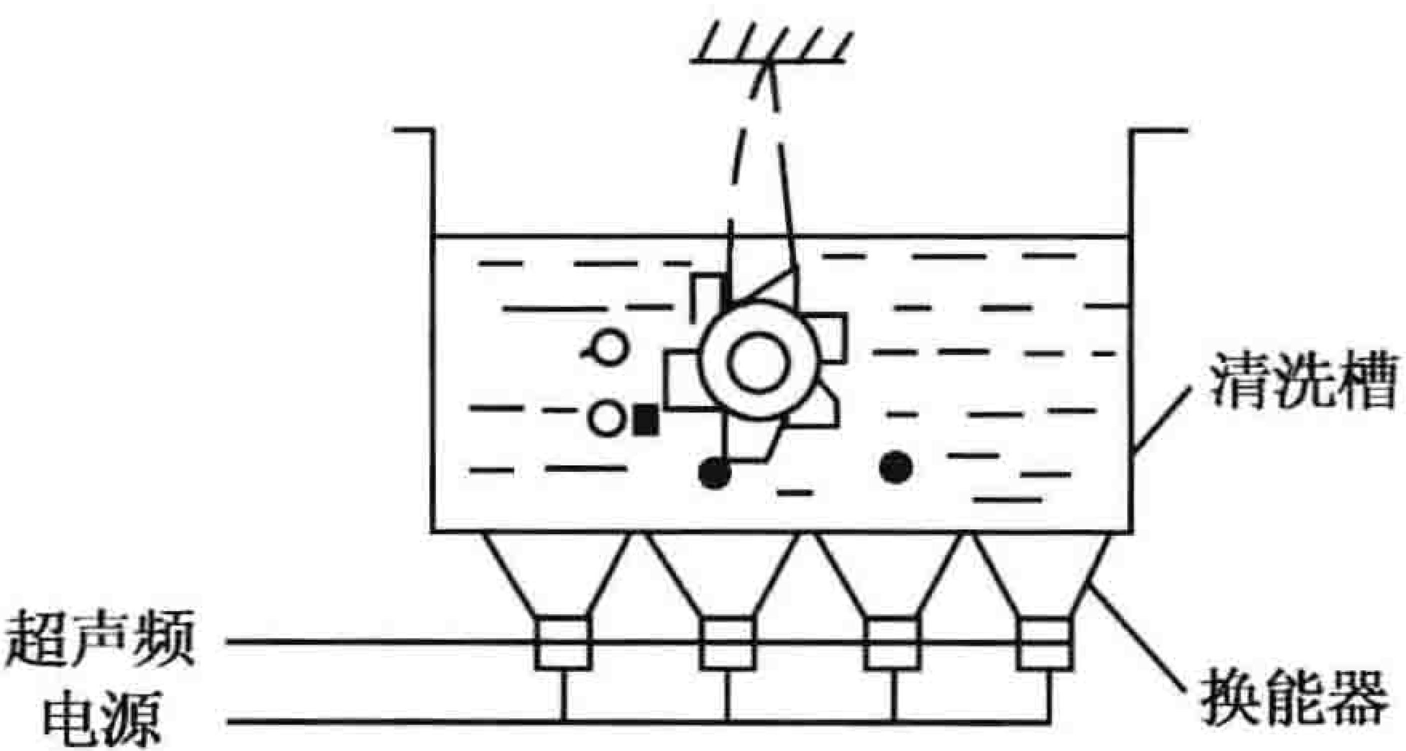


图 2-1　超声波清洗原理图

二、影响因素

超声波清洗的主要机制是超声空化作用，该作用的强弱与声学参数以及清洗液的物理化学性质有关，所以要达到最佳的清洗效果，必须选择适当的清洗液和声学参数。

对于一般液体，声强增加时，空化强度增大，空化事件增加，有利于清洗作用。但并不是声强越高，清洗效果越好，因为声强过高，在声源表面会产生大量无用的气泡，形成一道声屏障，声波在远离声源的空间强度就会变弱，从而削弱清洗作用。空化作用与超声波的频率有密切关系，超声波频率越低，在液体中越容易产生空化，产生的力度

越大，作用也越强，适用于工件初洗；频率高则超声波方向性强，适合于精细的物件清洗。

采用超声波清洗，一般有两类清洗剂：化学清洗剂和水基清洗剂。清洗介质的化学作用，可以加速超声波清洗效果，与超声波清洗的物理作用相结合，可对物件进行充分、彻底的清洗。

此外，清洗液的温度和作用于清洗物的静压力都对清洗效果有很大影响。清洗液温度越高时，空化核增加，对产生空化有利，但温度过高时，气泡中的蒸汽压增大，空化强度会降低。所以温度的选择要考虑对空化强度的影响，同时也要考虑清洗液的化学清洗作用。每一种液体都有一空化活跃的温度，如水清洗液较适宜的温度为 60℃，此时空化最活跃。

三、优　缺　点

超声波清洗技术是超声波众多工业应用中的一种，在世界上已有几十年的发展历史。与其他如化学、物理或机械的清洗方法相比，具有清洗速度快、效率高、成本低、对环境污染小、易于实现自动化、安全、可靠等特点，显示出了很大的优越性。尤其适用于清洗具有人们难以接触到的内腔、深盲孔及狭缝的复杂形状零件上的污物的独特优点，因此被称为“无孔不入”的清洗方法。

但是超声清洗也有其局限性，例如，对声反射强的材料（如金属、陶瓷和玻璃等）清洗效果好，而对声吸收大的材料（如布料、橡胶以及黏度大的污物）清洗效果差。

第二节　结构性能及使用

一、设 备 结 构

超声波清洗仪通常由超声源即超声波发生器和盛有清洗液的清洗槽两部分组成。超声波发生器有电子管式和晶体管式两种，其中后者近年发展很快，目前，国内外从中小功率到大功率都已形成系列产品。超声波发生器可分为振荡器、激励器、功率放大器和电源四个组成部分。多谐振荡器由两个晶体管构成，可调节电位器改变发生器的工作频率。当换能器由于负载、温度等因素影响，使工作频率偏移时，可通过调节电位器来适当改变多谐振荡器的振荡频率，使整个系统保持同步，从而保证换能器在最佳频率上工作。激励器由四个晶体管构成，推动功率放大器工作，功放单元为三路合成。

清洗槽的主体是一个盛液体的槽子，形状、尺寸、容积可根据被清洗工件来设计制造，有单缸型、多缸型等。清洗槽的主要构成部分是超声换能器，是用压电材料制成的夹心式换能器振子，利用来自超声发生器输出的电能加在振子两端，使其在对应方向上受压或受拉产生机械振动，发出超声波并将其传到清洗槽内。早期的换能器为磁致伸缩型，目前已多为压电晶体型所取代。换能器可粘接在清洗槽的底部、侧壁部或放置在槽内。清洗槽还配有专门的加热和控温装置，以便根据不同的清洗对象、清洗液类型进行温度选择。

二、分类及性能特点

超声波清洗设备有两大类：一类是以水溶液作为清洗剂的设备，这类设备包括超声频电功率源、超声换能器及相应的超声容器和电加热器；一种是单缸型，另一种是多缸型（多工位）连续清洗设备，时常带有定时及自动输送装置。另一类是以挥发性有机溶液，如三氯乙烯、三氯乙烷和氟里昂等作为清洗剂，这类设备除了上述各组成部分外，还需要有冷凝循环、油水分离及过滤回收有机溶液的附加设备。

目前国内外主要生产和开发各种专用清洗设备及在线生产的成套设备，也生产台式、小巧的清洗设备。小型设备的电功率只有几瓦，大型成套设备达几十千瓦到上百千瓦。20 世纪 50～60 年代大多采用磁致伸缩换能器，目前大多采用高效率的压电换能器；超声频电功率源过去多采用电子管器件，目前则使用固态器件，用这种器件制作的设备效率高而体积小，利用组合结构，功率可以做得很大，为大功率超声扩大应用创造了良好的条件。美国生产超声清洗设备的公司大约有 40 多家，比较有名的约有 10 家；西欧国家生产清洗设备的主要是英国、法国、德国及瑞士等国。下面列举国内外两家公司的超声波清洗器做简单比较。

（一）Transsonic TI-H-15 超声波清洗仪

该型号仪器为德国 Elma 公司产品，其工作体积为 12.2L，处理不同样品时可以有 25/45kHz 和 35/130kHz 两种频率提供选择。工作强度不高时选择 25kHz，工作强度高时选择 45kHz。加热功率为 1000W，温度可在 30～80℃范围内进行设定。该仪器具有脱气功能，用于除去样品中的气体，如可以为 HPLC 流动相进行脱气等。此外还具有连续产生并增加声压的功能，以达到优化超声清洗的目的。

（二）DL 型系列超声波清洗仪

DL 型系列超声波清洗仪为上海之信仪器有限公司产品，较其他同类产品具有噪音低、效率高、性能稳定、效果可靠等优点。该系列产品除其本身具有高效、高质量的清洗功能外，还具有脱气、提取、乳化、加速溶解、粉碎、分散等多种功能，从超声波清洗仪的功能的全面性和性能的优越性上来看，国产的超声波清洗设备大多能够满足生物化学和分子生物学实验室的清洗要求。

三、故 障 排 除

进入故障多发期的超声波清洗仪，经常会出现缸体完好无损但场效应管烧坏而导致的仪器故障。故障发生的原因多为场效应管长期使用，控制相位产生漂移，耐压耐流值降低，或由于静电感应使场效应管的栅极绝缘击穿而烧坏。在这种情况下，可以将电源部分进行改造，将原来的场效应管全部更换为 IGBT 管（隔离栅双极管），不仅排除了故障，还可以提高电源部分的工作性能。此外超声波清洗仪一般比较耗电，因此使用时一般开、关要特别注意，设备打开时最后温度设定要低，逐步升温，关闭时也将温度由高调到低，然后关闭电源，千万不能在使用超声波进行清洗的过程中突然关掉电源，这

样很容易使电源和电路部分烧断，损坏设备。对于国产设备更应如此，一定得按照说明书进行操作和维护，只有这样才能延长寿命达到充分利用的目的。

第三节　在生物学中的应用

超声波清洗始于20世纪50年代初，随着技术的进步，其应用范围日益扩大。超声波清洗在电子电器工业用于清洗半导体器件、电子管零件、印刷电路、继电器、开关和滤波器等；在机械工业中用于清洗齿轮、轴承、油泵油嘴、燃油过滤器、阀门及其他机械零件；在光学和医疗器械方面用于清洗各种透镜、眼镜及镜框、医用玻璃器皿、针管和手术器具等；在轻纺工业中用来清洗喷丝头、食品瓶、盖、模具及雕刻工艺品等。超声波清洗仪在生物学以及相关学科中的应用更是越来越广泛。在生物化学实验室中可对所用瓶罐进行清洗，生物学实验室中可用于显微镜、望远镜等光学系统及取样玻璃片的清洗，医用器具如口腔和外科器械的清洗，药瓶及某些食品瓶的清洗等。

第四节　超声波清洗仪的发展

随着机械工业、电子工业、光学工业、医药工业、核工业、航天工业等对超声波清洗的广泛应用，特别是像超大硅片、超细管道、超洁镜面、超微晶体管等高精度材料的清洗，对超声波清洗提出了更新更高的要求。实验结果表明，如果用传统的低频单缸清洗仪对这些材料和零件进行清洗，不是清洗的洁净度达不到要求，就是因为长时间的清洗而损坏被清洗的材料和零部件。但如果采用高频超声波和多缸式清洗仪则能达到良好的效果。

近十几年来，超声波清洗设备厂家不断推出许多新型的高效节能清洗设备，其总的发展趋势朝着两个方向迅速发展：一是朝高频方向发展；二是朝多缸式、传动链式、升降式方向发展。下面将分类介绍这些新型的超声波清洗设备。

一、高频超声波清洗

对于像硅片表面小至零点几微米的超微污物粒子，常规的超声波清洗仪无能为力，即使增加频率密度也无济于事。近来发展了一种兆赫兹级的高频超声波清洗技术，由于频率高，空化效应已不起作用，因此清洗的关键不是气泡，而在于高频压力波的擦洗作用，其对污物的去除率接近百分之百。高频清洗近来发展较快，主要用于超大规模集成电路芯片上的污物清洗以及硅晶片、陶瓷等特种污物的清洗。

二、聚焦式清洗

对于像纺织行业的喷丝板、过滤器之类微孔物件的清洗，常规的超声清洗效果不是十分理想，声强达不到要求，而采用机械扫描聚焦式超声清洗，喷丝板微孔中的污物脱离效果十分明显。聚焦式清洗要求达到高的声强，目前选用的频率以低频为主，常用20kHz 和 15kHz 两种频率，个别的频率也有 28kHz 的，其电功率在连续波情况下一般

为 500～700 W，在间隙脉冲工作状态下，功率可适当高些。

三、多频清洗

多频清洗即在一只清洗缸中，安装有两种或三种以上不同频率的换能器，由多只发生器分别推动各自频率的换能器。清洗器工作频率高时，在液体中空化强度低而空化密度大，工作频率低时则相反。低频超声波的强度高，对物体表面清洗有利；高频超声波空化密度高，冲击波能穿达凹槽、细缝、深孔等细微结构。同时缸中有多种频率的超声波，也克服了单频清洗驻波场造成的清洗不均匀的问题。

四、扫频和跳频清洗

扫频和跳频清洗都是为了改善缸中的声场结构，前者解决了缸中的不均匀驻波场，使清洗均匀。而跳频和多频一样兼顾到高低频清洗，不同的是跳频用的是一只换能器和一只发生器，其换能器本身有两个谐振频率，在第一谐振点带宽内做连续的频率变化，然后跳到另一带宽内进行扫频清洗，是一种高低频交替进行的清洗。

五、节水型超声波清洗设备

节水型超声波清洗设备将含氢水与兆声波组合使用，另外采用紫外线进行预处理，从而实现了设备的小型化，降低了纯水使用量和废液废水处理负荷。

大量工艺试验和生产实践结果表明，一种好的超声波清洗工艺除了要具备性能优良的超声波清洗仪及其相应辅助装置（如定时加热装置、循环泵、过滤器、冷凝系统、分离器等）外，合适的洗涤剂也是一个至关重要和不容忽视的因素。为了贯彻执行“蒙维利尔协议”这项国际性的环保条例，在清洗领域中正在采取各种措施解决取代有机溶剂（CFC/I. I. I 等）的问题，以最大限度减少清洗介质对环境的污染。目前欧洲正倾向于使用一种称为 VMS（挥发性硅氧甲烷）的化学物质作为清洗介质，以取代有机溶剂。这种介质符合环境保护局（EPA）的要求，但存在有易燃的问题，目前已经在欧洲某些厂家的清洗仪中试用。

主要参考文献

陈思忠．2002．我国功率超声技术近况与应用进展．声学技术，(1)：46～49

陈思忠．2004．超声波清洗技术与进展．洗净技术，2 (2)：7～12

冯立刚．1994．超声清机仪发生器的研制．声学技术，(4)：172

李春姝．1997．超声波清洗技术及其在纺织行业的应用．纺织器材，24 (3)：26～27

李梅，罗小红．2001．超声波清洗器在土壤农化分析中的应用．广西农业科学，(5)：248～249

林仲茂．1998．超声清洗发展概况．化学清洗，(1)：22～23

孟振庭．2000．超声清洗及其空化理论的新进展．渭南师范学院学报，(5)：20～21

丘泰球．1999．超声波防除积垢节能技术．甘蔗糖业，(4)：29～34

辛乐．2000．超声波清洗设备的目前发展方向．应用声学，19 (2)：40

严天惠．2002．超声波清洗的广泛应用．现代机械，(4)：103～104

张海燕．2002．超声波清洗技术．现代物理知识，14（6）：36

张元艺，申碧梅，李坤之．2002．超声波清洗器的故障检修和改造．电工技术，（6）：59～60

周海．1999．超声波清洗在蓝宝石镜面加工中的应用．机械设计与制造工程，28（2）：59～60

Bronin F A，Chernov A P. 1978．Ultrasonic Cleaning of Parts in Freon Mixtures．Mashinostroenie, Moscow

第三章　高压蒸汽灭菌器

分子生物学实验中工程菌的增殖、重组质粒的转化和细菌培养等工作，均要求所使用的试剂、器皿和实验用具严格灭菌，有的实验还要求没有核酸酶的污染，因此实验器械、试剂等的高压消毒必不可少。由于蒸汽是一种无色、无味的无害气体，生产成本低、获取方法简单、温度高、穿透力强、无污染，因此，目前高压蒸汽灭菌作为消毒和灭菌的主要手段，在生物实验室中被广泛使用。

第一节　概　　述

一、分　　类

目前普遍使用的高压灭菌器可分为两类：一类为下排气式高压灭菌。该类灭菌器温度高，热穿透力强，灭菌效果好。灭菌时间的计算是按照灭菌器柜室达到要求温度时算起，至灭菌完成为止，包括热力穿透时间、微生物热死时间和安全时间（一般为热死时间的一半）；由预热 20℃起至冷却完成为一个灭菌周期。另一类为抽气真空式蒸汽灭菌器。这类灭菌器在发达国家已普遍使用。目前在我国程控预真空压力蒸汽灭菌器是新型的比较先进的蒸汽灭菌器。其优点是：灭菌时间短，对消毒物品损害轻微，甚至对有盖容器的物品也可进行有效灭菌，工作环境温度较低，消毒后物品可以自动干燥等。

二、影响灭菌的因素和预防办法

影响灭菌效果的因素较多，概括起来有以下几个方面。

（一）敷料包体积的影响

敷料包体积过大，蒸汽不易穿透，加盖容器会导致蒸汽穿透受阻，容器内的空气不易排除。因此灭菌物品的体积大小要适宜；敷料包内敷料应叠成块状，上下交叉叠放，使之留有较多的空隙；捆扎不宜过紧，以利于蒸汽穿透；包装使用的容器宜小而浅，并应带有通气孔。

（二）物品排列疏密的影响

物品排列过密，影响蒸汽穿透，尤其是放在锅内下层的物品更不易得到充足的潜伏热而降低灭菌效果。一般来说消毒物品的体积不应超过灭菌室容积的 85％。

（三）重视压力阀、阻气器、排气管的保养

有的灭菌器设有压力调节阀，应经常对调节阀进行检查校验，切勿随意扭动调节阀

手轮。

(四) 错误观念的影响

一般认为按常规操作消毒物品就能无菌，这实际是一种错误观念。按常规操作只是一种正常消毒过程，并不能证明消毒物品已全部无菌，因此还要对灭菌效果进行测定。灭菌效果的测定方法主要有热电耦法、留点温度法、化学指示剂法、生物法等。最常用的是化学指示剂法，它是利用化合物的熔点来证明灭菌需要达到的温度，如硫磺熔点为119℃、苯甲酸熔点为123℃。用这种方法测定灭菌效果只能表明温度是否达标，而不能表明灭菌温度达标后所需的持续时间是否达到标准，所以这一类方法是间接反映灭菌效果的一种方法。生物测定法是目前最可靠的灭菌效果测定法之一，通过生物方法测定，能最后证明被消毒物是否有菌，因此对各类消毒物品都应定期用生物测定法检验灭菌效果。

第二节 结构与特点

一、组成结构（以预真空蒸汽灭菌器为例）

预真空蒸汽灭菌器的灭菌原理为：当蒸汽进入灭菌器内，遇到冷的消毒物品冷凝成液态，释放出大量热量，使消毒物品受热受潮。在热和潮湿的作用下，使细菌的蛋白质分解、凝固，从而达到灭菌的目的。该类灭菌器由真空系统、灭菌系统、排气系统、干燥系统和安全监测系统 5 个系统组成。

(一) 真空系统

被消毒物品处于抽真空的灭菌器内，有利于蒸汽迅速渗透消毒物品，抽真空过程中灭菌器温度下降，有利于凝结，放出潜热，提高消毒效果。抽真空程度高低与水压、密封情况有着直接关系。

(二) 灭菌系统

灭菌开始时间由选择继电器计时，送气电磁阀温度调节控制仪控制灭菌器，使灭菌器内温度保持在134℃左右，灭菌温度恒定在设定值内，灭菌时间一到，灭菌便结束。

(三) 排气系统

该系统用于进一步排出灭菌器内的蒸汽，直至灭菌器内压力为零，排气结束。

(四) 干燥系统

抽真空可使灭菌器内蒸汽进一步排出，温度降低，对消毒物品起干燥作用，同时使灭菌器内呈负压，此时可以打开门环。

(五) 安全监测系统

该系统监测灭菌器内负压回升情况，当灭菌器内同室外大气压差不多接近时，这时

灭菌器大门才能打开，该系统使设备的安全性大大增加。

二、不同类型自动灭菌器的性能特点

（一）MC8型灭菌器

该型号灭菌器具有以下优点：①智能化程度较高。可储存4个预设的温度循环程序，也可实行定温操作，保证每次循环开始前室内条件正确。②自动化程度高。每次开始时，只需按下开关键即可进行操作，极为方便。每次循环后，还可进行自动干燥处理。③防污染能力强。能有效避免污染物在箱内循环造成的污染，也能防止空气中污染物对箱体内部的污染。④用途广泛、操作方便。设备上有目视孔，可以随时观察仪器的清洁程度；有压力显示和压力解除开关；并可以对包裹的和未包裹的器皿中的液体进行消毒。

（二）MC-30L系列微电脑控制自动灭菌器

该类型微电脑控制自动灭菌器为日本ALP公司产品，也具有上述特点。但每个公司产品的偏重点不一样，用户在选择型号时要根据自己灭菌对象的特点选择适合自己需要的类型。该型号的显著特点是：①电子控制空气排出装置及定时自由蒸发系统，能确保灭菌仅在纯蒸汽环境下进行；自动排放阀在操作开始时自动关闭并在灭菌结束后自动开启卸压。②自保护功能完善。这是现代仪器设计的一个共同特点。该设备含声音警报，可提示仪器不同的运行状态。③可提供自动供水预热附属系统。例如，MC3032L型可选择停止空气排出的功能，以防止杆菌在室内扩散。

（三）日本TOMY高压灭菌锅

该型号高压灭菌锅构成材料比较讲究，自动化程度和智能化程度较高，主要是内设程序更加全面，功能更加齐全，适用范围更加广泛，使用更加方便。其腔体和吊篮为不锈钢结构，具有高强度防腐蚀功能；除全自动操作外，它同时还具有实时图形界面显示和声音警报功能；具有三组供选程序，完成从基本消毒到自动保温的全过程；8h加热可在消毒程序后连用或独立对溶化及无菌样品进行预处理；可进行99h的预运行设定，具有独立的温度和压力监测系统；含有便携式、内置的蒸汽产生器和通气系统；顶开式设计适合不同规格的容器和液体；底部排水管便于清洁，可用清洁液或水冲洗。

第三节　操作使用

一、使用方法（以脉动真空蒸汽灭菌器为例）

（一）B-D测试

B-D试验是由两位苏格兰微生物学家鲍埃（J. H. Bowie）和狄克（J. Dick）于1963年设计的，专用于测试真空式压力蒸汽灭菌器空气排除效果的试验。当测试表明空气排除彻底，灭菌抽真空系统良好时灭菌器方可正常使用。因此每天进行物品灭菌前应先将

B-D测试包置于预真空灭菌器排气口处进行B-D测试以检测灭菌器的真空有效性，灭菌器合格才能进行物品的灭菌。

（二）物品装载

将待消毒包竖直放入灭菌炉内，并关好双侧炉门进行灭菌。

（三）物品灭菌

选择预真空灭菌的程式，通过阅读灭菌器的电脑屏幕或电脑输出打印纸了解灭菌过程，该过程包括三个时期。

1. 条件设定期

灭菌器利用真空泵先将炉内的空气排出，该过程称为清除过程。然后将炉内抽成负压，再将外源蒸汽引入炉内，称为灭菌的脉冲过程（即灭菌器内发生了从负压至正压的变化过程），如此反复脉冲4次。最后再将蒸汽引入炉内使炉内温度和压力逐渐升高，称为充气过程。

2. 蒸汽处理期

当炉内温度达到132℃以上，压力为0.2MPa时，炉内蒸汽对物品进行灭菌，所需时间为4min，此过程也称蒸汽灭菌处理期。

3. 排气期

灭菌周期结束后预真空灭菌器的蒸汽被主动抽出炉外的过程称为排气过程；继而炉内被抽成负压，物品通过真空而被干燥称为真空干燥过程，最后空气通过一个去除污染的过滤器被输入炉内加快物品干燥，称为进气过程。

（四）灭菌后的操作

当物品灭菌完成后，灭菌器内温度降至80℃以下，压力为零时，可打开通向储存区的炉门取物。

二、预真空蒸汽灭菌器的常见故障排除

（一）基本安装要求

灭菌器的常见故障多因工作条件不具备而致。其正常工作条件应有电源、水源、气源和环境等方面。

电源要求三相四线制，380V电压。若缺相，则真空泵不工作，若相位有误，则真空泵可能反转，不能正常工作。

水源要求水源压力为0.15～0.3MPa。供水不足将导致水环真空泵工作噪声大或真空度降低，甚至不抽真空。

气源要求压力为0.3～0.6MPa。过低的气源压力将直接影响消毒质量，过高的压力则有安全隐患，这时候则需要安装减压阀缓冲，以确保安全。

环境要求通风良好，以免夏季室温过高；冬季保温条件要好，防止水源冻结，水环真空泵无法工作。

（二）常见故障及其排除方法

1）故障现象：关闭柜门后各指示灯不显示。

原因分析：柜门未关紧。维修：再次关紧柜门。

2）故障现象：关闭柜门后无电源显示。

原因分析：查电源是否断电，柜门电源开关是否损坏或脱位，保险丝是否烧坏或松动。

维修：检查总电源是否断电，如断电应通知电工及时维修；关闭电源拔出柜机电源开关键，检查线头是否脱位；打开操作键下方护板，检查保险丝是否烧坏。

3）故障现象：操作时按真空键抽负压指针不下降。

原因分析：可能为停水或真空泵与电机连接轴脱位或破损造成。

维修：连接合适的水源；卸掉侧面护板，如连接轴脱位则予以复位并加以紧固，如破损可用扳手将电机底座螺杆拧出，移动电机，取出连接轴更换新套位，然后将电机复位对正，拧紧底座螺杆，紧固轴套。

4）故障现象：操作时按真空键抽负压时指针下降缓慢，真空不到位。

原因分析：水压不足或柜门密封圈老化，各铜管接头螺帽松动，压力控制器不密封或底座破损。

维修：水压达到后继续操作；或将柜门打开，拧下柜门压条螺杆，更换垫圈；或用小扳手紧固各铜管接头螺帽，用十字螺丝刀紧固压力控制器底座螺钉或更换垫圈；或用扳手将铜管与压力控制器连接处拧掉，用十字螺丝刀取下控制器底座螺钉，取下底座，更换同型配件并加以调整、校正。

5）故障现象：灭菌工作时，灭菌器也向外排气。

原因分析：灭菌过程是指在三次脉动抽真空后，向内室进蒸汽，直至内室压力达0.21MPa左右、温度为132～135℃，并维持5min左右的消毒灭菌过程。这个阶段，排气电磁阀和手动排气阀均应关闭（两者相并联，手动阀是在电磁阀损坏时备用的），只有进气电磁阀工作。如果灭菌过程中，灭菌器向外排气，则需要检测排气电磁阀是否误动，造成排气，并且检查它所在的这一管路是否确有温热感，以证明内室蒸汽是否通过这里排出。若测量其工作电压为零，则证明没有电误动作。只有关闭电源及气源，拆下排气电磁阀检查。若电磁阀吸锤下方被针头或纱布等消毒品卡位则需取出后装回电磁阀，重新开机，试机后看是否可以正常工作。消毒工作人员平时应仔细认真，防止物品漏入排气管道，造成人为故障。

6）故障现象：灭菌时，内室温度表指示达135℃，但内室压力不是0.21MPa，有时仅为0.15～0.17MPa，温度与压力不同步，造成消毒控制不合格。

原因分析：灭菌器在三次脉动抽真空后，内室开始进气。此时进气电磁阀的工作电

压仪受内室温度控制仪的控制，即温度达到135℃时，温控仪常闭触点断开，致使进气电磁阀失电，停止进气，若在灭菌过程中温度不足135℃，此时温控仪再次控制进气阀得电，进气补充，这样来维持内室温度及内室压力的相对平衡。所以灭菌内室压力不足肯定与温控仪有关，但温控仪往往很少出现故障，一般是温度传感器损坏（其一端插入内室）所致。传感器由于长期高温工作，感温头易硬化损坏，电阻值不能随温度呈线性变化，导致温控仪指示的温度不正确。更换同型号的温度传感器后察看工作是否正常。

（三）注意事项

预真空蒸汽灭菌器一般要有专人操作、专人管理、专人保养并填写各项保养记录，认真检查仪器工作状况；操作前应检查各仪表、指示灯、水、电、蒸汽是否正常；每日清洁一次，每星期疏通清洗疏水器、电磁阀内芯，更换滤纸，柜门、泵机上油；半年一次大检修，检查安全阀、压力表是否合格等；同时常备零件也要配齐。

第四节　高压蒸汽灭菌器的发展

虽然高压蒸汽灭菌器能起到很好的灭菌效果，但对于不能耐受高温、湿热的精密仪器、介入性操作的导管等的彻底灭菌则无能为力或者起不到很好的效果。环氧乙烷气体灭菌器弥补了这个缺陷。但是由于环氧乙烷对人体有一定的毒性，因此使用时需要选择合适的工作环境。使用环氧乙烷气体灭菌器灭菌前必须进行常规检查，溶液、油类、潮湿类物品严禁用本灭菌器灭菌。在选择灭菌物品的包装材料时，重要的是看它能否被环氧乙烷气体所穿透。目前，环氧乙烷气体最易穿透瓦楞纸板，其次是马粪纸、棉布、牛皮纸、对聚乙烯、聚氯乙烯等。为了确保被灭菌物品的终末质量，物品经环氧乙烷气体灭菌后，需要进行彻底气洗，即脱气处理，以驱除残留的环氧乙烷，确保使用者的安全。

主要参考文献

丛莉，周文光．2002．高压蒸气灭菌器应用研究．医疗装备，(4)：24～25
胡煦．1999．预真空蒸汽灭菌器简介及维修．医疗装备，(12)：32
刘晓华，谢文，蔡晓芸等．2001．脉动真空蒸汽灭菌器在物品灭菌中的应用．现代医学仪器与应用，(3)：29～30
罗李之，陈靖，杨正友．2001．脉动真空蒸汽灭菌器故障原因分析与维修．医疗设备信息，(12)：67
郁红菊，张春玉．2001．AⅢE型环氧乙烷灭菌器的使用体会．医学研究生学报，(1)：93
仲辉．2001．脉动预真空灭菌器常见故障分析．医疗装备，(1)：20

第四章　自动洗板机

多相酶联免疫吸附（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）实验是生物化学与分子生物学实验室常见的一种应用于抗原-抗体结合研究、发光实验和细胞培养等的实验手段。在 ELISA 免疫反应之后，需要经过一个特殊而严格的洗涤步骤（即洗板），除去微滴板中未结合物和干扰物再进行测定，用以保证结果的可靠性。该步骤不同于其他实验用具的清洗，它是 ELISA 实验中必不可少的重要操作步骤。稳定而有效的洗板过程才能保证实验结果的可靠性和可重复性，否则必将造成实验结果的波动乃至失败。最初人们主要依靠人工洗板，随着 ELISA 技术的发展，洗板技术日趋成熟，自动酶标洗板机也应运而生。洗板技术与自动洗板机的发展，也推动了 ELISA 实验向微量化、定量化发展，并且成为 ELISA 实验质量控制的重要手段。

自动洗板的清洗效果总体要优于手工洗板，二者的优缺点比较见表 4-1。

表 4-1　自动洗板与手工洗板的优缺点比较

比较项目	洗板机洗板	手工洗板
对实验室污染	小	大
对实验室危害	无	有
工作量	小	大
工作速度	快	慢
洗板条件	恒定，适合定量操作	不恒定，对定量检测有影响
误差	无，浸泡时间可设定，保证洗板效果注液量可设定，注液均匀	有，洗板浸泡时间不统一，造成时间差大，如加样不均匀、溢出、漏加等
受操作人员主观因素影响	小	大
排干后的残余量	有，进口机＜3μl，国产＜8μl	无

第一节　基本原理

一般洗涤微滴板的步骤依次为吸干反应液、将洗涤液注满微滴孔、浸泡一定时间、吸走孔内液，上述步骤重复几次。如果有未结合物和干扰物未被冲洗干净，或者冲洗不均匀，就会直接影响检测结果的准确性和重复性。自动洗板机一般用双头真空/压力泵作真空压力源，在管路上还设置一电磁阀，以实现自动吸液、注液功能。微滴板驱动单元完成走板功能，以实现微滴板的逐排冲洗。清洗头升降单元则在吸液过程中，将清洗头可靠地降入到微滴孔的适当位置，吸干液体，然后升高。大多数自动洗板机还具有定时摇匀功能，以增强清洗效果。所有这些操作都通过微电脑控制，键盘和显示屏完成洗板参数的选择和输入。

第二节　结构及性能

一、基本结构

自动洗板机主要由机壳、清洗头升降单元、微滴板驱动单元、压力和真空单元、开/关电源、微处理器及外设等几大部分组成。

（一）清洗头升降单元

主要由清洗头、螺母、丝杆和升降电机等组成。在清洗头上，注射管和吸液管为同轴，注射管在吸液管的内部，这样可以在同一位置实现吸液-注液-吸液的洗涤步骤，提高工作效率（有的洗板机注射管位于吸液管上部，前者比后者短，如奥地利的 SLT 智能化洗板机）。由于 U 形底、V 形底和平底等不同形状的微滴板的冲洗高度不同，因此要求清洗头冲洗位置的高度能自动精确地进行调整。螺旋转动机构可以利用丝杆螺母的自锁性，保证清洗头和螺母不会因重力而带动丝杆转动。清洗头与螺母相固定，升降电机带动丝杆转动，丝杆再带动螺母和清洗头上下运动，完成清洗头的升降功能（有的洗板机如奥地利的 SLT 智能化洗板机，其高度的升降可以用微电脑键盘上的控制键进行自动调节）。

（二）微滴板驱动单元

主要由微滴板载盒、滑板、传动带、滑轨和走板电机等组成。磁力传动可提高整机的密封性，微滴板载盒与其驱动机构之间由机壳左部的导板完全隔离。在磁力作用下，微滴板载盒在机壳左部的导板内来回运动，完成微滴板载盒的进退功能。

（三）压力和真空单元

主要由真空/压力泵、真空管路、压力管路、电磁阀、洗液瓶和废液瓶等组成。

（四）开关电源、微处理器控制单元及外设

开关电源同时为电磁阀、升降电机提供直流电源。微处理器系统由单片机、程序存储器、数据存储器及相应的锁存译码芯片构成，通过 I/O 接口来控制键盘和显示屏等外设。通过键盘可输入多项洗板参数。微处理器系统还可以控制走板及升降电机的启停，实现双向运动，同时 I/O 接口为电磁阀驱动电路送出控制信号，以改变压力管路上电磁阀的工作状态。断电保护电路用以保护微处理器内部和外部 RAM 中的数据在电源断电时不丢失。

二、不同型号设备的性能特点

（一）Wellwash Plus 型全自动多功能洗板机

该型号设备为芬兰 Labsystem 公司产品，其性能特点概括起来具有操作自动化，方法

设定和仪器管理智能化，清洗对象广泛化，吸液控制精确化等优点。例如，在操作和方法设定上，所有的操作参数都可以通过编程的形式将方法输入微电脑，最多可以编辑和储存40个清洗程序。调用方法时，只需按执行键即可完成全部洗涤操作。该设备可以针对U形、V形和平底板各类微滴板进行清洗，还可以定义和保存10种类型的清洗程序，从而满足对不同厂家所生产的不同类型的板进行各种方式的清洗。在加液精度上，该设备能确保低残液量和孔间一致性，96孔板在每孔加300μl蒸馏水的条件下，加液精确性可达到5%。此外，设备的自检功能和程序的密码保护也成为现代化智能设备的共同特点。

（二）MW96型自动洗板机

MW96自动洗板机为美国贝克曼库尔特有限公司产品。相对Wellwash Plus型，该自动洗板机的加液范围宽一些，可达50～2000μl；加液精度更高（<2%CV值）[CV (coefficient of variation) 指变异系数，用标准偏差除以平均值]，控制更加准确（洗涤后每孔残液量<1μl）；具有吸液强度和振动速度的调节功能（具有三种吸液强度和三种振动速度可供选择）。但是设定程序的数量仅为20个。

第三节　自动洗板机的使用

一、故障排除（以奥地利产SLT自动洗板机为例）

一般来说，智能化自动洗板机的故障在许多方面具有相似的地方，因此通过对某一厂家某一型号的设备的故障了解，往往可以给其他型号设备的故障排除提供思路和参考。

SLT型自动洗板机的清洗头有16针，微孔板上每个孔对应一个进液针和一个排液针。该仪器还能够使用9种软件来定义板型，用来控制圆底孔的微孔板的进液位置和排液位置，其进液和排液速度也有5种选择。仪器的运行必须按操作说明书进行，否则会造成仪器损坏或程序错误，使仪器的安全性得不到保证。常见的故障有以下几个方面。

1. 不能排废液

工作时能听到排废液泵有轻微的运转声，但不能从板上吸取液体。测废液泵工作电压是否正常；若正常，拆下泵体，检查是否因为内部脏物使排液泵堵死，可用超声波清洗，再用蒸馏水冲净干净，重新安装后一般可排除故障。

2. 关机后程序丢失

开机时发现以前编制的程序丢失；重新编程后能正常工作，但关机后再次开机时故障重现。此故障为明显的CMOS电池失效，无法保存程序所致。取下机壳，在主电路板左下角有一焊在主板上的绿色扁平小方块，即为CMOS电池，卸下后用相同型号的电池更换，就可以排除故障。

3. 银针清堵时针齐根断在一排液针孔内

拆下清洗头臂，用英制内六角拧下正面的两个定位柱，取下密封圈。再用另一根新

针把断针往里顶，使之在废液槽内伸出一小段，再用镊子轻轻拉出断针，重新固定新针后即可。

4. 操作时某一个通道不能进液

先检查其他三个通道是否工作正常。若正常，再检查不能进液的通道的胶管有无堵塞；若无，再测通道选择螺线管阀工作电压是否正常，若无相应吸合动作，更换后可排除故障。

二、维护保养

1）仪器应安装在平稳的工作台上，电源电压要相对稳定，这是保证仪器正常运转的关键。

2）洗板过程中，如果向酶板孔中加入缓冲液时有气泡产生或有缓冲液溢出孔外，说明针孔堵塞，这时应暂停洗板，将洗板针取下，用比洗板针小一号的注射针上下连通几下，然后装上，转换冲洗键，按 Enter 键用蒸馏水连冲几次即可。

3）万一有缓冲液溢出，应立即暂停，清理干净后再进行洗板。

4）洗标本前后要用蒸馏水冲洗管道，关机前要把菜单回复到待机状态再关机，然后用塑料罩或布罩住。

三、注意事项

1）开机前，冲洗针头且吸/排液针都要自动冲刷，以保证洗板工作正常进行。

2）冲洗模式板采用国际通用板从 1 开始按顺序进行，每排自动清洗 3 次，浸泡 3min，最后吸干。整个过程自动清洗，可以利用该时间做其他相关工作。

3）溢满式方式冲洗效果较好，既可避免因手工冲洗定量不准且相互交叉反应的缺点，又洗掉了反应杯上部的游离的酶结合物，使显色更加稳定。

4）包被板不合格，或双排针有时不能正常进入样品杯，而是碰在样品杯沿上，这些都会影响洗板工作，甚至使针孔弯曲，因此最好选择同一厂家的模板作清洗专用板。

5）血清反应物应保持新鲜，避免血块及干斑以及脂血清和蛋白质凝固物进入反应孔。清洗前一定要检查反应孔内有无异物沉积，一旦疏忽，会导致吸样针头阻塞，针头阻塞仪器并不报警，所以平时应注意观察冲洗水流是否均匀一致，发现阻塞应立即按下 STOP 键，掀起上活动臂，用该机专配的细针头疏通，再用蒸馏水冲洗。另外关机前也要用一定比例的 84 消毒液浸泡 30s，然后用蒸馏水冲洗，冲净溶解的蛋白质和溶液中盐类。

总之，无论设备的自动化程度和智能化程度有多高，我们都要以敏锐的观察力和细心的态度随时管理和判断设备操作的正确性。自动化程度和智能化程度高纵然能够使我们的操作变得极为方便，但也增加了我们对设备维护和保养的工作强度和难度，只有我们维护和保养好设备，克服“一切自动化、一切放心化”的思想，才能使设备更好地按照实验者的思想顺利准确地完成实验任务，也才能使设备充分发挥出作用来。

第四节　洗板机的应用

自动洗板机应用广泛，凡是具有酶联免疫吸附技术（ELISA）的酶反应板皆可使用。应用范围包括：肿瘤标记物的检测、传染性疾病的检查及体检（如肝炎10项）、人类免疫缺陷病毒（HIV）抗体的检测、梅毒血清反应素试验、沙眼衣原体感染的血清学检查和TORCH感染的血清学检查等。应用ELISA完成这些方面的检测后，最好采用先进的全自动洗板机进行洗板，以保证测试的准确性和提高实验的可靠性。

第五节　自动洗板机的发展

自动洗板机是医疗科研单位进行酶联免疫实验时，检测各种感染性病毒所必备的设备之一，其作用是通过清洗，实现酶联免疫实验过程中结合相与游离相的分离。目前大部分洗板机采用机械振动来增强清洗效果，但效果并不十分明显，一般无振动装置的洗板机至少需清洗5遍，采用机械振动的洗板机也需清洗4遍。而超声波清洗与传统的清洗方法相比，清洗时间短且效果好；清洗的时间和效果容易通过调整超声波发生器的振动频率和超声清洗的时间来改变。因此，将超声波清洗技术与医用洗板机相结合，可以方便地控制清洗的次数和清洗效果。这类超声波洗板机主要由机械传动系统、流体控制系统、超声波清洗系统、电器控制系统四大部分组成，工作顺序依次为逐排注液、超声波清洗、逐排吸液。

但超声波清洗的强度不宜过高，时间也不宜过长，以免将微孔内的结合成分清洗掉，因此一般需通过实验确定合适的超声振动频率和超声清洗时间。带有超声波清洗功能的自动洗板机将在生物化学和分子生物学实验中得到越来越多的应用。

主要参考文献

李冠军．2001．奥地利产SLT自动洗板机故障检修四例．医疗装备，(9)：50

卢青虎，沈喜．1998．Columbus洗板机应用体会．医疗装备，(6)：38

王坦，傅水根，李生录等．2000．超声波在洗板机中的应用．机械设计与制造，(2)：60～61

吴兴平．2003．DNX-9620电脑洗板机的应用及维护．现代医学仪器与应用，(2)：34

邹俊伟，许士坤，李海珠等．1998．1379型自动洗板机的研制．医疗保健器具，(3)：149～151

第二篇　控 温 设 备

生物实验室除了达到最基本的无尘无菌条件外，还需要保持恒定的温度、湿度和压力梯度。其中维持温度的设备分为整体冷却装置和局部冷却装置两大类。在生物实验室中，整体冷却主要采用中央空调，不仅可以控温，同时还可以维持室内湿度。局部冷却装置包括可控速率冷冻器、循环冷却系统、超低温冰箱、制冰机等。其中可控速率冷冻器一般采用甲醇为传热媒介，加上微处理程序控制，配合液态氮，提供了一个快捷、简单而精确的控制冷冻方法，可进行生物样品如组织细胞及胚胎的储存。循环冷却系统广泛用于旋转蒸发、蒸馏、激光和 AAS、ICP、FTIR、GC/MS、NMR、电镜等多种分析仪器的冷却，同时不会对仪器造成污染，且可精确控制温度和压力。本篇将详细介绍用于局部冷冻的另外两种常用仪器——超低温冰箱和制冰机，前者主要用于生物样品的冷藏，而后者用于提供冷却生物样品所需的冰。

而对于生物样品的冷却，除了利用传统的冰块进行制冷或温度控制，新型的制冷物质如干冰和液氮也在生物学实验中有广泛的应用。干冰，即固态二氧化碳，成品分为雪花粉状和晶体块状，外观与冰相似，能不经过液体而直接变成气体。其制法是由液态二氧化碳经节流膨胀，再经干冰压缩机压缩得到。干冰制冷是利用干冰升华制冷，制冷量大，降温速度快，且价格相对便宜，充灌速度快，使用方便，是一种非常理想的冷源物质。液氮是目前实验室最常用的冷却物质，本篇将详细介绍液氮罐这一基本设备的使用和应用。

第五章　超低温冰箱

生物化学与分子生物学实验室中可以根据冷冻条件购置不同的控制温度的冰箱，如－20℃、－40℃、－70℃、－85℃、－152℃等。其中后两者为超低温冰箱（ultra low temperature freezer)，是20世纪后期发展起来的用于生物样品或药品的低温保存和储藏的设备，在生物研究、临床、医药和工业等领域都具有广泛的用途。可用于保存药物、疫苗、酶、激素、干细胞、血小板、精液、移植的皮肤以及从人体抽取的标本、植物种子的种质库、基因克隆库和一些重要的生物和化学试剂等。

在分子克隆实验中，－70℃超低温冰箱被广泛用于储存感受态大肠杆菌、感受态细胞和λ噬菌体原种。

第一节　制冷原理

超低温冰箱一般采用二级制冷，第一级的制冷剂为R-12（23.0oz，1oz＝28.349 523g)，设计压力高压为400ppsi（1ppsi＝6.894 76×10^3Pa)，低压为90ppsi。第二级制冷的冷凝器和第一级制冷的蒸发器是放在一起的；第二级的制冷剂为R-503(8.5oz）和R-290（0.7oz）的混合体，设计的高低压均为300ppsi。感温探头为热敏电阻，根据阻值的大小（即温度的高低）在面板上显示不同的温度。接通电源时，当面板显示温度比设定的温度高时，第一级压缩机首先启动，第一级制冷系统开始工作，使得第二级制冷系统的冷凝器温度下降，即第二级的制冷剂温度下降，经几分钟的延时后，第二级制冷系统也开始工作，它的蒸发器在冰箱内壁，这可使冰箱内部温度下降很多，它的冷凝器放出的热量全部由第一级制冷系统的蒸发器吸收，第一级冷凝器放出的热量则散入空气中。当冰箱内部温度达到设定温度后，感温探头电阻把信息传出，控制继电器失电断开，两级制冷系统全部停止工作。当冰箱内温度再次升高，超出设定的温度时，冰箱再次重复上述运作过程，从而使冰箱内温度始终保持在设定的温度左右。

第二节　实验设备

一、组成结构

超低温冰箱一般有卧式和立式两种箱体。内箱体一般分为多个承物层，每层均设计有可独立开关的内门。外箱体一般由五块冷轧钢板相互直接拼接而成。箱体内外各有60mm和80mm的聚亚氨脂泡沫材料构成。自动调温器为铂电阻敏感器，用于对温度的精确控制。制冷剂现在一般采用环保型制冷剂，以达到环保要求。

超低温冰箱的制冷系统基本采用复叠式制冷的工作原理，选用两台全封闭压缩机作

为高、低温级压缩机使用。低温级蒸发器的紫铜管以盘管形式直接盘附于内箱体外侧，并用导热胶泥填堵于盘管与箱壁之间的缝隙中，以增加热交换效果。冷凝蒸发器为壳管式结构，内部为四管螺纹型紫铜管，采用逆流式热交换方式。低温级系统中还加配有气热交换器，可使从蒸发器出来的低压气体同进入冷凝蒸发器前的高压气体进行热交换，这样不但减少了冷凝蒸发器的热负荷，而且充分利用了热量。过滤器多采用除蜡型过滤器，其目的是有效去除冷冻油中的石蜡，以降低系统“油堵”的可能性。

此外超低温冰箱根据不同的使用用途还可以选配一些附件，例如，温度记录仪，便于永久记录运行参数；二氧化碳备用系统，用于特殊情况下，保证保存环境的气体保持正常状态；电压增压器，可保证压缩机在低压状态下正常工作。

二、超低温冰箱的性能特点

国外超低温保存技术发展较早，产品也较成熟，其中尤以日本 SANYO、美国 FORMA、NUAIRE、REVCO 等的－85℃超低温冰箱为代表。这些超低温冰箱一般都具有比较齐全的设备运行保证功能。例如，高温警报功能，停电、过滤网堵塞检测功能，自动输入补助功能，样品安全性警报系统，微处理和模拟控制系统，二氧化碳备用系统和记录仪系统等。一般考察超低温冰箱的性能时，应从最低制冷温度、体积大小、外形特点（卧式或立式）、压缩机噪音大小、震动幅度、箱体内的温度均一性、故障率（尤其是压缩机）和选配件种类等结合自己的使用要求和实验室的空间排布等情况进行全面考虑。

第三节　常见故障维修和保养

一、常见故障及其排除

超低温冰箱虽然制冷系统和控制电路都比较复杂，但常见故障主要是循环系统和电路部分故障，下面简要介绍几种常见故障及其排除办法。

1. 接通电源后，总电源的空气开关自动断开

排除方法：检查第一级制冷系统的压缩机是否损坏，若损坏则会造成短路，引起电源保护。可以更换配件，若没有原厂配件，可经测算更换相当功率的冰箱压缩机，将管道焊接好，经过加压检查完管道气密性后抽真空并加入 R-12 氟利昂 23.0oz，再开机检测是否正常。该故障一般是因为电源不稳定造成的，因为第一级先启动，故损坏通常都在第一级，这种情况下，一般只要加装延时稳压电源，就不会再出现该故障。

2. 箱内温度未达到设定温度就已经停止工作

排除方法：虽然箱内未达到设定温度，但是面板显示温度却已经达到设定温度。这是由于检测温度的热敏电阻损坏，需要更换配件。若没有原厂配件，可重新安装一套温度控制系统，即可消除故障。

3. 冰箱制冷效果降低，人触摸箱体金属部分有电击感觉

排除方法：用万用表测量冰箱漏电情况，采用分段法检查。在给高温级压缩机单独通电运行时，检查是否是由于该压缩机漏电引起整个箱体带电。静态检测压缩机接线柱，注意观察电动机绕组内引线插头部分，若与机壳有打火痕迹，表明该处漏电。采用把接线柱部分连同周围一部分壳体一起更换的方法，装上机体后通电使其运转，检查有无漏电现象，等压缩机各项指标正常后，装回低温冰箱底座上，连接管道，检漏、抽空、充注适量制冷剂使冰箱恢复正常运行。

二、维护及保养

超低温冰箱的维护和保养对于延长其寿命和正常使用尤为重要，如果温度控制不准确常常导致所保存对象受损，对实验结果造成很大影响，从而影响研究工作的正常进行。

1. 每月清洁一次，以保证其清洁度

用干布清除冰箱内外部和配件上的少量尘埃，如果冰箱太脏则使用中性洗涤剂，清洗后再用纯净水彻底冲洗。但不可在冰箱内部和上部冲水，否则会损坏绝缘材料并导致故障。压缩机和其他机械部分不需要使用润滑油。清洁压缩机后部的电扇务必小心。清洁完毕后进行安全检查，确保冰箱插头插好，不要虚接；确保插头没有异常热度；确保冰箱背部的电源电线和分配电线没有破裂和刻痕。

2. 警报器启动报警

当遇到警报器启动报警时，通常可通过以下方面进行检查。第一，检查电源是否有问题或插头是否被拉出插座；第二，检查内部温度计是否超出合适的范围，在此情况下，物品置入会使冰箱升温，并触发警报器；第三，检查是否一次性置入物品过多。

3. 冰箱冷却不充分

检查蒸发器表面是否有冰霜；冰箱门是否开关过频；冰箱背部是否接触墙面；是否放入过多物品。

4. 冰箱噪音过大

检查底板是否坚固；冰箱是否稳固；如不稳，调好活动螺丝以使四角稳固地支撑在底板上；是否有物件接触到冰箱背部。

如果制冷效果差，冰箱不停机，散热管不热，蒸发器有很小气流声，这些是因为慢渗漏造成制冷剂严重缺损的缘故。在实际使用过程中，还会遇到许多其他问题，这类问题的解决方法需要不断地积累经验方可排除障碍，使得超低温冰箱达到最佳的工作状态。

第四节　发展趋势

未来主要关注超低温冰箱的可靠性和能够满足不同样品的储存条件，包括温度和气

体组成。此外，有些公司为了满足生物材料对温度均一性的较高要求，在冰箱货架中采用了用于冷却的金属圈，或者将货架设计为孔形，解决散热问题，提高冷冻速度和增加温度的一致性。未来超低温冰箱的设计还必须考虑节能和对环境保护的要求，要配有环境检测系统。同时，纳米材料也将成为未来超低温冰箱制备中很有前途的材料。

主要参考文献

安源，周寿林．2000．浅议－80℃低温冰箱的研制．医疗装备，(11)：9～10
陈峻，林芸．1998．低温冰箱的护理．医疗装备，(5)：31
杨少华，朱文胜，林国庆．1998．修复美国超低温冰箱压缩机故障的一种方法．医疗装备，(4)：45
周立庆．2002．超低温冰箱的原理及维修．医疗设备信息，(1)：65～66

第六章　制　冰　机

制冰机用于满足大多数核酸、蛋白质的实验操作所需要的低温环境，以减少核酸酶或蛋白酶的降解。

第一节　简　　介

一、制冰原理

制冰机的制冰蒸发器又称发生器，实际是一个构造特殊的立式壳管式换热器，管子内为循环水泵输送的制冰水，管壁外和壳体之间充满着低温低压的制冷剂——氨。氨液由分离器经过输液阀从换热器底部流入。蒸发后的氨蒸气由换热器顶部电磁阀导入氨液分离器，使发生器管子中的水遇冷结冰，未结冰的水流入下部水箱继续循环，当水结冰到一定厚度时，水泵停止工作，发生器上部水箱里的水流入下部水箱，而上部水箱中的冰则凝结干燥。发生器中的冰然后经过脱冰过程形成冰块。发生器脱冰过程是利用压缩机排出的热氨蒸气加热实现的。首先关闭电磁主阀，并通过换能器顶部的电磁阀加压，使氨液经过输液阀输回到氨液分离器，待氨液排尽后，输液阀自动关闭，脱冰电磁阀打开，再从换热器底部导入热氨气加热整个发生器，原来结在管中的冰受热下滑，被紧贴在换热器底部的割冰刀切成小段，落入下方冰篮中，冰篮与冰刀连在一起同步旋转，将切成的冰段从出冰口甩出发生器。出冰结束后冰刀、冰篮停止旋转，制冰水泵重新启动，预冷发生器后，打开电磁主阀，重新开始制冰循环。

二、影响制冰效率的因素

（一）部分负荷运转的状态

随着冰的形成和冰的厚度的增加，蒸发器的传热性能迅速下降，制冰系统的负荷随之降低。因此，制冰机的工作过程是变负荷过程，即制冰机大部分时间处于部分负荷状态并在低效率下运行。如果不进行负荷调节，必将造成能量浪费。采用试验方法确定负荷随结冰过程进行或冰厚度变化的规律，并利用变频调节技术进行制冰机的能量调节，必将提高其制冰效率。

（二）脱冰时间

脱冰时间的长短是影响制冰效率的一个重要因素。脱冰时间加长，会使制冰周期延长，对于热气脱冰和电加热脱冰方式来说，往往会使能耗增加。因此，可从制冰部件的结构和制冰部件材料两方面入手，寻找缩短脱冰时间的途径。

（三）制冰机结构

制冰机内部构造设计的不同也可影响制冰效率。采用散水方式相对于喷水方式，前

者的管路阻力较小，输水功率消耗较低，而且散水方式不需要像喷水方式那样需要通过喷水管来回摆动才能保证冰面的均匀性。从结冰水向结冰面的输送方式到冰块脱冰后进入储冰仓的过程，尽可能不采用额外的电机驱动等外力因素，可以节省制冰机的功率。制冰机制冰方式中单位重量冰块与冻结面的接触面积越大，冻结效率越高。因此从制冰机整体结构上考虑可适当提高制冰机的效率。

第二节 实验设备

一、组成结构

制冰机可分为机体部分、传动部分、仪表控制系统、水系统和制冰系统 5 个部分。

（一）机体部分

由外壳组装焊接而成，前后防板可拆卸，以利于检查和维修。制冰系统和储冰室采用不锈钢制成，表面光滑耐腐蚀。储冰室和机体间、门架及门架压板间一般用发泡保温材料做成，门配有磁性橡胶密封条，以最大限度地防止外界热量导入。

（二）传动部分

采用三相发电机，经减速系统带动制冰螺杆旋转。

（三）仪表控制系统

即操作面板，包括电源和制冰的开关等。

（四）制冰系统

制冷剂分为两路，一路是专供制冰用的，另一路是脱冰用的。脱冰时，脱冰电磁阀打开，使高温高压制冷剂蒸汽进入蒸发器凝结放热帮助脱冰。另外，一般在制冰机的制冷系统中需设置气液分离器，目的是将制冷剂的蒸汽与液体分离，防止液态制冷剂进入压缩机产生“液击”故障。为提高制冰机的制冷能力，系统中除了毛细管与低压回气管构成气液交换器以外，毛细管还缠绕在液气分离器的下部也构成热交换器，这样可以减少节流过程中制冷剂的汽化，增加了流入蒸发器的可供汽化吸热的液态制冷剂的数量，可起到提高制冷系数的作用。

（五）水系统

制冰机供水系统与其制冷系统一样重要，必须与制冷系统协调配合，才能保证制冰机的正常运行。当制冰机工作时，供水电磁阀打开，供水一般经过制冰部件流入储水槽。待注入规定的水量后，供水电磁阀关闭，供水停止，开始制冰运转。水泵将储水槽的水泵入制冰机上部的散水盘内，水由盘底的散水孔流向制冰面，未冻结的水再流回水槽。此时由于部分水冻结，导致储水槽内的水位下降，当水位低于规定位置时，浮标开

关闭合，制冰结束。在制冰过程中，矿物质在水槽底部沉积使制冰水浑浊也会导致制作的冰块质量下降，因此必须及时、充分地排水。一般可采用全排水、稀释和底部排水三种方式将余水排净。

二、不同型号制冰机的性能特点

商业制冰机主要由制冷系统、制冰部件、供水系统及控制系统组成。按制冰机制冰部件的结构形式可分为冰模式制冰机、平板式制冰机、棒式制冰机和管式制冰机等 4 种形式。

（一）德国 ZIEGRA 公司制冰机

德国 ZIEGRA 公司是专业生产制冰机的厂家，主要生产日制冰量 30kg 至 2t 的制冰机。产品主要特点有：外壳和内胆均为不锈钢材料；安装方便，取冰容易；噪音低；倒闭水循环系统，满足卫生要求；储冰室满后电源自动切断；冰取出后则自动开机，具有相当的自动化程度。

（二）美国 SIM 公司制冰机 IF300-150

该型制冰机设计精密，材料讲究，滑门用聚氨酯浇注而成，增强了对外部的绝热效果；门为上拉型设计，方便易用；内部用尼龙酯浇注而成，防腐蚀，可轻松清洗；具有四层安全设备，能确保制冰机安全可靠。该型制冰机可用于制造实验室用的雪花形冰。

第三节 操 作 使 用

一、操 作 步 骤

制冰机的操作一般比较简单，大概分为以下几个步骤：

1）将制冰机后部的出水管一端放在出水槽内，将进水管接在自来水龙头上拧至合适位置。

2）待水槽中水满至 2/3 后，接上电源，打开电源开关，电源指示灯亮，无报警声。

3）打开制冰开关，制冰指示灯亮。此时请务必检查螺杆旋转方向，确保实际旋转方向与标记的方向一致，制冰机即开始工作。

4）使用完毕后，切断水源、电源，并保持机器清洁。

二、注 意 事 项

制冰机操作一般需要注意以下几点：

1）机器安装时必须放平稳，螺杆旋转方向为逆时针，每次开机必须检查其旋转方向。改变螺杆旋转方向的方法是将电源插座中的三相接线的任两根对调位置后接上即可。

2）切断水源后，必须在制冰筒内的冰都被送到储冰室后才能关机。

3）一次使用完毕后，如距离下次使用间隔时间较长，必须将储冰室内的冰取出，并将储冰室擦干净。

4）水箱水位未达到规定水位时，报警器响，应立即加水。

5）出冰口下有温度传感器，当储冰室中的冰多到与该传感器接触时，制冷系统便停止工作，因此要注意保持储冰室中的冰位，防止制冷中断。

第四节　制冰机的最新进展

近年来，国外各种直接蒸发式自动化制冰机正在不断推向市场。下面介绍一下目前国内外生产的主要型号的制冰机。

一、片冰机

片冰机的制冰原理为：制冷剂在夹套圆筒的环形空间内蒸发吸热，冷水从圆筒内壁或外壁喷淋而下，在壁面结冰；刮刀将壁面结成的冰刮下，冰的厚度一般为1～3mm。这种制冰机的优点是不需周期脱冰，可连续制冰，操作方便。冰的冷却面积大，与被冷却物接触良好，冷却效果好。但冰融化速度快，不易储存。

二、管冰机

管冰机的制冰原理为：冰的发生器是一个立式壳管式热交换器，水在管子内流动，管子外面为氨制冷剂蒸发吸热，冰层在管子内壁形成，厚度为5～13mm，结冰时间为13～26min。脱冰是由压缩机排出的热氨气体来进行的，脱冰时间约30s左右，结成的管冰向下滑动，制冰器下面的割刀旋转时将管冰削成合适的长度，流入螺旋输送机将管冰送入冰库。管冰生产时的蒸发温度比片冰生产时的蒸发温度要高，当获得2mm厚的冰时，需要15℃水温，冷凝温度－30℃。管冰比片冰要省电40%。

三、板冰机

板冰机的制冰原理为：冰在平板蒸发器表面形成，板内制冷剂蒸发吸热，脱冰也是采用热气体脱冰。板冰厚度可达6～20mm，结冰时间为12～45min。由于板冰厚度可在很大范围内调节，适用范围广，虽然需热气体周期脱冰，但也可补偿一定的能耗。挪威Finsan等公司已经推出该类产品，但目前国内还没有板冰机的生产厂家。

四、颗粒冰机

上述的片冰机、管冰机和板冰机都是使水在金属的表面上冷却而冻结成冰的，而颗粒制冰机的制冰原理是使水溶液温度降低后，直接在溶液中形成单个的冰晶体，颗粒大小约为2～3mm，不需周期脱冰。颗粒冰具有较好的流动性，可以用泵将冰送到需要处，使用十分方便，且颗粒冰接触面积大，因此冷却速度快，效果好。

五、太阳能制冰机

太阳能制冰机的制冰原理为：在正常运行的条件下，吸附床内的吸附剂已吸饱制冷

剂。循环从早上开始，吸附床被太阳能加热，当吸附床内吸附剂被加热到一定的温度时，制冷剂在吸附床内开始蒸发，吸附床内的压力升高，制冷剂蒸汽沿着管道流入冷凝器，在冷凝器中冷凝，冷凝下来的液体进入蒸发器，这一过程称为解吸。夜晚，吸附床内吸附剂随太阳日照的消失逐渐冷却，当相应吸附床内制冷剂压力下降到低于蒸发温度下制冷剂工作的饱和压力后，蒸发器中的制冷剂液体因压力减小而沸腾，制冷剂由液态变为气态，吸附床内吸附剂吸附蒸发器内制冷剂，该过程称为吸附。吸附过程中由于制冷剂发生相变，因而需要从外界吸收热量，也就是通常所说的吸附制冷过程。将吸附制冷过程所产生的低温环境通过绝缘箱体对水传递，并形成冰。因此，太阳能吸附式制冷系统的循环过程是间歇式的。系统运行时，白天为加热解吸过程，晚上为吸附制冷过程，晚上制成的冰块在白天供用户使用。该型制冰机为高节能制冰机，具有很好的市场前景。

总之，制冰机的发展是朝着节能、环保、方便和经济的方向发展。

主要参考文献

杜建通，宋垚臻，吕金虎．2001．商业制冰机的结构及影响其效率的因素．制冷与空调，(2)：52～56

郜建明，吴炳荣．1995．管冰机制冰原理与调试．制冷，(3)：88～89

孙长江，王如竹，李明．2003．民用型太阳能制冰机的研究．能源工程，(2)：14～16

徐世琼，沈月新．1995．食品冻结装置与制冰机的最近进展．制冷技术，(1)：19～24

Boubakri J J，Guilleminot，Meunier．2000．Adsorptive solar powered ice maker．Experiment and model．Solar Energy，69：249～263

Mli，Wang R Z．2002．A study of the effects of collector and environment parameters on the performance of a solar powered solid adsorption refrigerator．Renewable Energy，27：369～382

第七章　液　氮　罐

在生物学实验中，很多实验条件及材料的处理和保存都需要极端的低温环境。液氮是提供低温的常用物质之一，可用于冻存细胞和保存疫苗等。随着科学技术的不断发展，液氮的用途越来越广泛，在医院里也被用来进行冷疗，在金属物质的特性研究和电子仪器方面也被广泛应用，所以用于存储液氮的容器即液氮罐，就成为生物化学与分子生物学实验室中常用的低温设备之一。

第一节　简　　介

一、构　　造

从构造上来讲，液氮罐多为铝合金或不锈钢制造，分内外两层，即内胆和外槽。内胆一般为耐腐蚀性的铝合金，颈管是玻璃钢，在颈管的周围和底部夹层装有吸附剂。内外槽之间是绝缘材料，在罐的上面有一真空排气口，是专门用来抽真空的，使两槽之间保持真空。

二、不同型号液氮罐的性能特点

目前，国内外生产液氮罐的厂家很多，型号种类也很多，可以满足各种生物化学和分子生物学实验中不同冷藏存储的需要。美国 MVE 公司是低温生物样品储存标准的创立者，其产品种类齐全，性能优异，可用于各种科研、工业和临床机构液氮冻存和低温运输。下面就以美国 MVE 公司的各个系列产品为例来介绍不同型号液氮罐的性能特点。

（一）SC 系列/XC 系列

该系列液氮罐适用于小量样本在－196℃条件下的长期储存。其整体构造为铝质结构，轻巧方便；液氮挥发量小，维护简单；防护措施到位，设有锁位，防止随意移动；容量从 3.6～47.4L 可选；有圆筒架及方形架，适用于不同样品的储存需要。

（二）CryoSystem 系列

该系列适用于中等范围的冷冻管保存，液氮挥发量低，宽口罐颈设计，易于取放样本。罐体为轻型铝质，强度高，可具 3 年真空保用期。盖体设计严谨，绝热性能好；可存储 2000～6000 个样品。配件齐全，可选择冷冻盒、带轮底座、备用软木塞和相分离器等配件，使用方便。

（三）Vapro Shippers 系列

该系列液氮罐适用于生物标本在－150℃低温液氮环境下保存与运输；使用了超疏

水性液氮吸附剂，能够有效限制潮湿度，延长保存时间；体积从 1.5～10L 可选；能够满足国际认证的“无害”运输标准；有运输包装盒、备用软木塞、吊桶和低温运输架等可选配件，满足不同的使用要求。

第二节　使用与保管

一、使用前的检查

液氮罐在充填液氮之前，首先要检查外壳有无凹陷，真空排气口是否完好。若被碰坏，真空度则会降低，严重时进气不能保温，这样罐上部会结霜，液氮损耗大，失去继续使用的价值。其次，检查罐的内部，若有异物，必须取出，以防内胆被腐蚀。

二、液氮的充填

填充液氮时要小心谨慎。对于新罐或处于干燥状态的罐一定要缓慢填充并进行预冷，以防降温太快损坏内胆，减少使用年限。充填液氮时不要将液氮倒在真空排气口上，以免造成真空度下降。盖塞是用绝热材料制造的，既能防止液氮蒸发，也能起到固定提筒的作用，所以开关时要尽量减少磨损，以延长使用寿命。

三、使用过程中的检查

使用过程中要经常检查。可以用眼观测也可以用手触摸外壳，若发现外表挂霜，应停止使用；特别是颈管内壁附霜结冰时不宜用小刀去刮，以防颈管内壁受到破坏，造成真空不良，而是应将液氮取出，让其自然融化。

四、液氮罐的放置

液氮罐要存放在通风良好的阴凉处，不要在太阳光下直晒。由于其制造精密及其固有特性，无论在使用或存放时，液氮罐均不准倾斜、横放、倒置、堆压、相互撞击或与其他物件碰撞，要做到轻拿轻放并始终保持直立。

五、液氮罐的清洗

液氮罐闲置不用时，要用清水冲洗干净，将水排净，用鼓风机吹干，常温下放置待用。液氮罐内的液氮挥发完后，所剩遗漏物质（如冷冻精子）很快融化，变成液态物质而附在内胆上，会对铝合金的内胆造成腐蚀，若形成空洞，液氮罐就会报废，因此液氮罐内液氮耗尽后对罐子进行刷洗是十分必要的。具体的刷洗办法如下：首先把液氮罐内提筒取出，液氮移出，放置 2～3 天，待罐内温度上升到 0℃左右，再倒入 30℃左右的温水，用布擦洗。若发现个别融化物质粘在内胆底上，一定要细心洗刷干净。然后再用清水冲洗数次，之后倒置液氮罐，放在室内安全不宜翻倒处，自然风干，或如前所述用鼓风机风干。注意在整个刷洗过程中，动作要轻慢，倒入水的温度不可超过 40℃，总重不要超过 2kg 为宜。

六、液氮罐的安全运输

液氮罐在运输过程中必须装在木架内垫好软垫，并固定好。罐与罐之间要用填充物隔开，防止颠簸撞击，严防倾倒。装卸车时要严防液氮罐碰击，更不能在地上随意拖拉，以免减少液氮罐的使用寿命。

第三节　液氮罐在生物学实验中的应用

一、在细胞培养过程中的使用

细胞培养的一般过程，主要包括准备、取材、培养和冻存复苏 4 步。为保存细胞，特别是不易获得的突变型细胞或细胞株，要将细胞冻存。冻存的温度一般用－196℃液氮温度，将细胞收集至冻存管中加入含保护剂（一般为二甲基亚砜或甘油）的培养基，以一定的冷却速度冻存，最终保存于液氮中。在极低的温度下，细胞保存的时间几乎是无限的。目前美国标准细胞库或细胞银行（ATCC）液氮冻存有 3200 个已经过鉴定的细胞系（1992），其中包括来自正常人和各种疾病患者的皮肤成纤维细胞系和来自不同物种的近 75 个杂交瘤细胞株。

二、胚胎冷冻保存技术

胚胎冷冻保存技术是指在低温条件下利用低温保护剂保存胚胎的一门技术。这一技术是 20 世纪后半叶随着人工授精技术广泛应用而产生的，目前已成为了现代生命科学研究必备的手段之一。动物胚胎的冷冻保存原理就是因为低温降低了胚胎内的变质反应速度，温度越低，胚胎保存时间就越长。目前已研究出多种胚胎冷冻保存方法，包括慢速冷冻法、快速冷冻法、一步冷冻法、直接移植冷冻法和玻璃化冷冻法等。其中玻璃化冷冻法的步骤如下：①将胚胎在室温下放入 25％玻璃化溶液（VS 液）中预处理 15min；②将预处理后的胚胎放在高浓度（75％～90％）的 VS 液中保存 20～40min；③将经过两步抗冻剂处理的胚胎直接投入液氮中保存。

此外还可以用液氮罐保存菌种、疫苗、骨组织、精子等物质，均可达到很好的长期存储的效果。

第四节　液氮罐联用仪器简介

一、胚胎冷冻仪

胚胎冷冻仪是为了适应胚胎移植的需要而设计的制冷设备。使用液氮作为制冷剂运行平稳；可以单独对每一程序进行密码设置，并可灵活编程；可直接与打印机或计算机相连，附带的消毒程序可以对机器本身进行高温消毒；控温范围一般为－170～－100℃，有一定的控温速率和精度；设有多重保护功能，包括冲注液氮时自动加热、液氮低位报警、程序运行时错误关机的预防等；电磁阀、压缩机等机械零件（只有通风扇

作为通风使用）可大大降低故障率。

二、冷冻研磨机

冷冻研磨机是将样品装入密闭的研磨容器中，浸入液氮中预冷，以电磁为动力，带动金属撞击棒进行粉碎研磨。该设备可用于生物化学中DNA检测、聚合物结构分析、痕迹元素的判断、食品分析、矿物质研究、医疗外科手术的辅助、药品性能检测、纺织品组成成分的鉴定等领域。

冷冻研磨机操作时，将盛装破碎物的样品瓶浸入液氮中，破碎过程始终在持续低温下进行。此外，冷冻研磨机还具有以下特点：①样品瓶在破碎过程中处于全封闭状态，被完整地保留在瓶内，可确保对危险、重要物品的控制；②样品瓶可单独向用户提供，每次破碎后均可清洗，消除了样品间交叉污染以及设备带来的外界污染；③采用电子控制方法，使得破碎的全过程程序化，增加了样品与样品间的连续性；④在破碎的过程中，唯一的运动部件是样品瓶的碰撞器，因此大大降低了在低温设备中的机械应力，延长了设备的使用寿命；⑤通过冷冻研磨机上面板的液晶显示器和键盘，可实现仪器的程序控制，使操作更具人性化。

液氮和液氮罐的应用范围还在扩大，相关联的仪器设备还在不断出现，这将在现代生物化学和分子生物学领域起到越来越重要的作用。

主要参考文献

王同仁. 1994. 液氮罐使用保管注意事项. 黄牛杂志，20（1）：61～62
赵峰，顾树勤，冯彬. 1994. 谈液氮罐的使用与保管. 山东畜牧兽医，（3）：48
赵光远. 1994. 刷洗液氮罐不可忽视. 中国畜牧杂志，30（4）：16

第三篇　水质制备系统

在生物化学与分子生物学的大多数实验中，对溶剂水的纯度要求较高，例如，在核酸分子的制备过程中要求用无菌水溶解核酸，防止其他生物分子和杂质的污染。使用常规的双重蒸馏法制备的纯净水，虽然可去除水中大部分有机杂质，但制备时间太长，且去除许多无机盐离子的效果不够明显。因此，实验室最好配备超纯水器用来制备电导率极低的和没有热源的高纯度水，因为超纯水器可利用紫外线消毒的辅助设施和过滤装置，比较彻底地去除原料水中的无机离子和微生物杂质，并可以制备不同纯度等级和适合于不同需要的超纯水。本篇将详细介绍生物学实验室最常用的制备水的设备——超纯水器。

第八章　超 纯 水 器

随着分子生物学的飞速发展，许多实验对溶剂水的纯度要求越来越高，单蒸水常常难以满足要求，因此需要进行双重蒸馏，去除水中大部分的有机杂质。但双蒸水制备时间太长，且对残留的许多无机盐杂质无能为力，从而使双蒸水在分子生物学领域的应用受到了局限。超纯水的应用在高精度的仪器分析中是不可缺少的，因此许多厂家都在研究有效的分离方法，利用离子交换和反渗透等原理制成各种具有较强去离子能力的分离柱，将它们合理组合，并巧妙地增加紫外线消毒和超滤装置，从而制成不同类型的超纯水器去除原料水中的无机离子和微生物杂质，以满足生物化学与分子生物学实验中对水质的各种要求。

第一节　基本理论与技术

超纯水是指蒸馏残留物低于几个微克/升或者纳克/升的水，是目前世界上电导率最低的水。生命科学领域是需要超纯水的主要领域之一。在生命科学研究中，必须重视除去水中的微生物、热源物质和无机离子等。通常超纯水的制备体系包括了原料水（水源地的水）的过滤以及活性炭吸附等前处理过程和反渗透、离子交换、精细过滤、超滤、杀菌等深层处理过程。这些深层处理过程囊括了超纯水制备中的核心技术。

一、实验室的用水标准

天然水中通常含有 5 类杂质：第一类是电解质，包括带电粒子。常见的阳离子有 H^+、Na^+、K^+、NH_4^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Fe^{3+}、Cu^{2+}、Mn^{2+}、Al^{3+} 等；常见的阴离子有 F^-、Cl^-、NO_3^-、HCO_3^-、SO_4^{2-}、PO_4^{3-}、$H_2PO_4^-$、$HSiO_3^-$ 等。第二类是有机物质，如有机酸、农药、烃类、醇类和酯类等。第三类为颗粒物。第四类为微生物。第五类为溶解气体，包括 N_2、O_2、Cl_2、H_2S、CO、CO_2、CH_4 等。所谓水的纯化，就是要除掉这些杂质。杂质去除得越彻底，水质也就越纯净。

国家对分析实验室的用水规格进行了技术规定，将其分为三个级别。其中一级水用于要求严格的分析实验，如液相色谱分析用水等；二级水用于无机痕量分析，如原子吸收光谱分析用水等；三级水用于一般化学分析实验。

二、水的纯化技术

（一）蒸馏

蒸馏器皿的材质包括了玻璃蒸馏器、石英蒸馏器和金属材质蒸馏器。其中金属材质有铜、不锈钢和白金等。按蒸馏的次数可将蒸馏过程分为一次、二次和多次蒸馏。此

外，为了去掉一些特殊的杂质，还需采取一些特殊的措施，例如，预先加入一些高锰酸钾可去除易氧化物，加入少许磷酸可去除三价铁，加入少许不挥发酸可制取无氨水等。蒸馏法能去除水中大于1μm的所有不挥发物质和大部分0.09～1μm的可溶性小分子无机盐，因而能有效去除水中细菌、热源和其他大部分有机物质。所以蒸馏水可以满足普通分析实验室的用水要求。但是，由于蒸馏法很难排除二氧化碳的溶入，所以水的电阻率很低，达不到兆欧级，因此不能满足一些生物化学和分子生物学实验的要求。

（二）离子交换

离子交换（ion exchange）是水纯化中去除离子最常用的方法。采用离子交换树脂进行离子交换是通过自来水中的正离子与离子交换树脂中的 H^+ 交换，负离子与离子交换树脂上的 OH^- 交换，从而达到纯化水的目的。离子交换树脂经过一段时间的使用后，需要再生或更换。通过离子交换去除离子，能除去几乎所有的离子物质。离子交换法可以获得十几兆欧的去离子水，但无法去除有机物，TOC（总有机碳）和COD（化学需氧量）值往往比源水还高。这是因为树脂质量不好或是树脂的预处理不彻底，即树脂中所含的低聚物、单体、添加剂等没有除尽，或树脂不稳定，不断地释放出分解产物，这些都以高含量的TOC或COD形式表现出来。例如，自来水的COD值为2mg/L时，经过去离子处理得到的去离子水的COD值则为5～10mg/L。当然，使用质量好的树脂就会得到较满意的结果。

离子交换树脂是去除水中杂质的主要材料，它是一种由有机单体分子聚合而成的具有三维立体空间网架结构的多孔海绵状的高分子化合物，其立体交联结构使离子交换树脂具有在各种水溶液和一般有机溶剂中的难溶性和比较稳定的物理化学性质。离子交换树脂的网络交联程度是以合成树脂时所加入的交联剂占整个单体总重量的百分比来表示的，称为离子交换树脂的交联度。交联剂加入越多，交联度越大，树脂的强度越高。同时，树脂的交联程度和交联范围又决定了树脂内的孔道结构，人们常把这种孔道称为凝胶孔。孔径很小，一般为3nm以下，孔的大小随树脂所处状态和化学环境的不同而改变。当其处于水合状态时，分子链舒展，链间距增大，凝胶孔也扩大；处于干燥状态时，分子链收缩，凝胶孔就缩小。溶液中各种离子的性质、浓度及pH等发生变化都会影响凝胶孔的改变。孔径的大小又决定了离子交换树脂对离子的选择性，大孔径离子交换树脂具有真正的毛细孔结构，其孔径比分子间距离大得多，可达几千甚至上万埃，而且孔径的大小受外界条件变化的影响也很小。在离子交换树脂大分子网架的主链上带有许多可以活动的功能团，这些功能团由带电荷的被称作反离子的固定离子组成，它们以离子键与固定离子相结合，反离子可以被解离成可以自由移动的离子，与周围的其他同类离子进行交换。

广泛使用的树脂主要有四类：相当于一元磺酸的强酸型树脂，相当于羧酸的弱酸型树脂，相当于强碱的强碱型树脂和相当于伯、仲、叔胺的弱碱型树脂。前两种酸型树脂又称为阳离子交换树脂，后两种则称阴离子交换树脂。按孔径又可分为凝胶型、大孔型两类。20世纪70年代发展起来的有螯合树脂、氧化还原树脂、吸附树脂。80年代各种特殊功能树脂及其应用、工艺、技术和设备都在蓬勃发展。离子交换剂除树脂外，近年

来在纯水制备中广泛使用的还有离子交换纤维。离子交换纤维以各种合成纤维为基体，其交换基团也有强酸、强碱、弱酸、弱碱、两性和螯合等，与颗粒状树脂相比，其交换和洗脱速度更快。

离子交换法主要有复床和混床两种制备方式。复床式是按阳床-阴床-阳床-阴床-混床的方式连接并生产去离子水。早期多采用这种方式，便于树脂再生。混床可以看成是许多阴、阳离子交换树脂交错排列而成的多级式复床。混床去离子的效果好于复床，但树脂再生不方便。

（三）反渗透

反渗透（reverse osmosis，RO）是目前应用最广的一种脱盐技术，与超滤和微孔过滤同称为膜分离技术。渗透是水通过一个半透膜从低浓度流向高浓度的一边。如果使用一个高压泵对高浓度溶液提供大于渗透压的压力，水分子将被迫通过半透膜到达低浓度的一边，这一步骤称为反渗透。反渗透可以滤除90%～99%的绝大多数污染物，主要特点如下：

1）反渗透过程不发生相变，与有相变的分离法（如蒸馏）等其他分离法相比，能耗较低。

2）反渗透技术适用于有机物、无机物、微粒等物质，具有广泛的分离范围，尤其是对胶体也有较强的去除能力，特别适用于各种水处理。由于反渗透膜截留粒子的直径小于10μm，因此可以除去水中几乎100%的有机物、细菌、热源，以及99%以上的各种离子。

3）由于只用压力作为膜分离的推动力，因而膜分离装置操作简单，便于自控和维修。

4）设备占地面积小。

反渗透技术也具有自身的缺点：

1）由于反渗透装置要在高压下运转，因此必须配备相应的高压泵和高压管路。

2）由于回收率的限制，源水只有50%～75%被利用。而对于超纯水制备来说，进入反渗透器之前，源水已经过相应的预处理，水质比较好，如果对浓缩水不进行有效地利用，将会造成浪费。

3）为了延长反渗透膜的寿命，在反渗透之前要加强预处理（包括浊度、pH、杀菌等）措施，还要对膜进行定期的清洗等。

（四）电渗析

电渗析（electronic dialysis，ED）是利用离子交换膜的选择透过性进行工作。电渗析器主要组成部分是离子交换膜，分为阳膜和阴膜。阳膜只允许阳离子通过而阴离子被阻挡，而阴膜只允许阴离子通过而阳离子被阻挡。在外加电场的作用下，如图8-1所示，水中的离子做定向迁移，阳离子向负极移动，通过阳离子交换膜进入浓缩室，但受到阴离子交换膜阻挡，停留在浓缩室；阴离子向正极移动，到达阴离子交换膜表面时，由于离子交换膜的选择透过性，也进入浓缩室，但同样因受到阳膜的阻挡而留在浓缩室

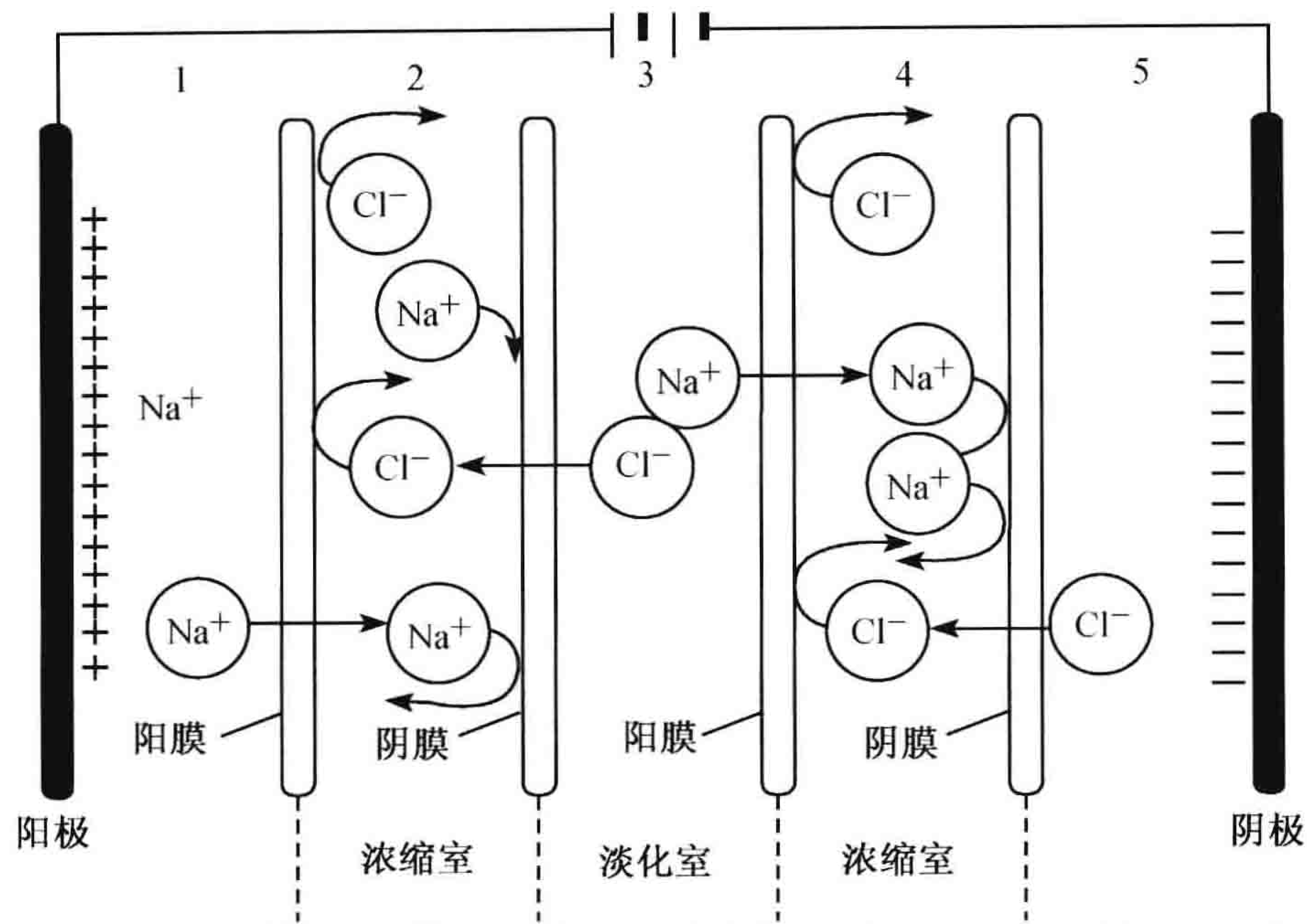


图 8-1　电渗析过程示意图

中，这样，就使一部分水除盐，一部分水被浓缩。

（五）电析去离子技术

电析去离子（electrodeionizaion，EDI）又称电除盐，是 20 世纪 90 年代国际上逐步发展起来的新型纯水、超纯水制备技术，是纯水生产技术史上的一次革命性的进步。该技术巧妙地将电渗析技术和离子交换技术相融合，通过阴、阳离子交换膜对阴、阳离子的选择性透过作用与离子交换树脂对离子的交换作用，在直流电场的作用下实现离子的定向迁移，从而完成水的深度除盐，同时，水电离产生的氢离子和氢氧根离子对离子交换树脂进行再生，因此不需酸碱化学再生而能连续制取超纯水。该项技术操作简单，且具有优异的环保特性，使洁净生产技术在电子、电力、医药、化工和实验室等领域得到日趋广泛的应用。

1. EDI 的工作原理

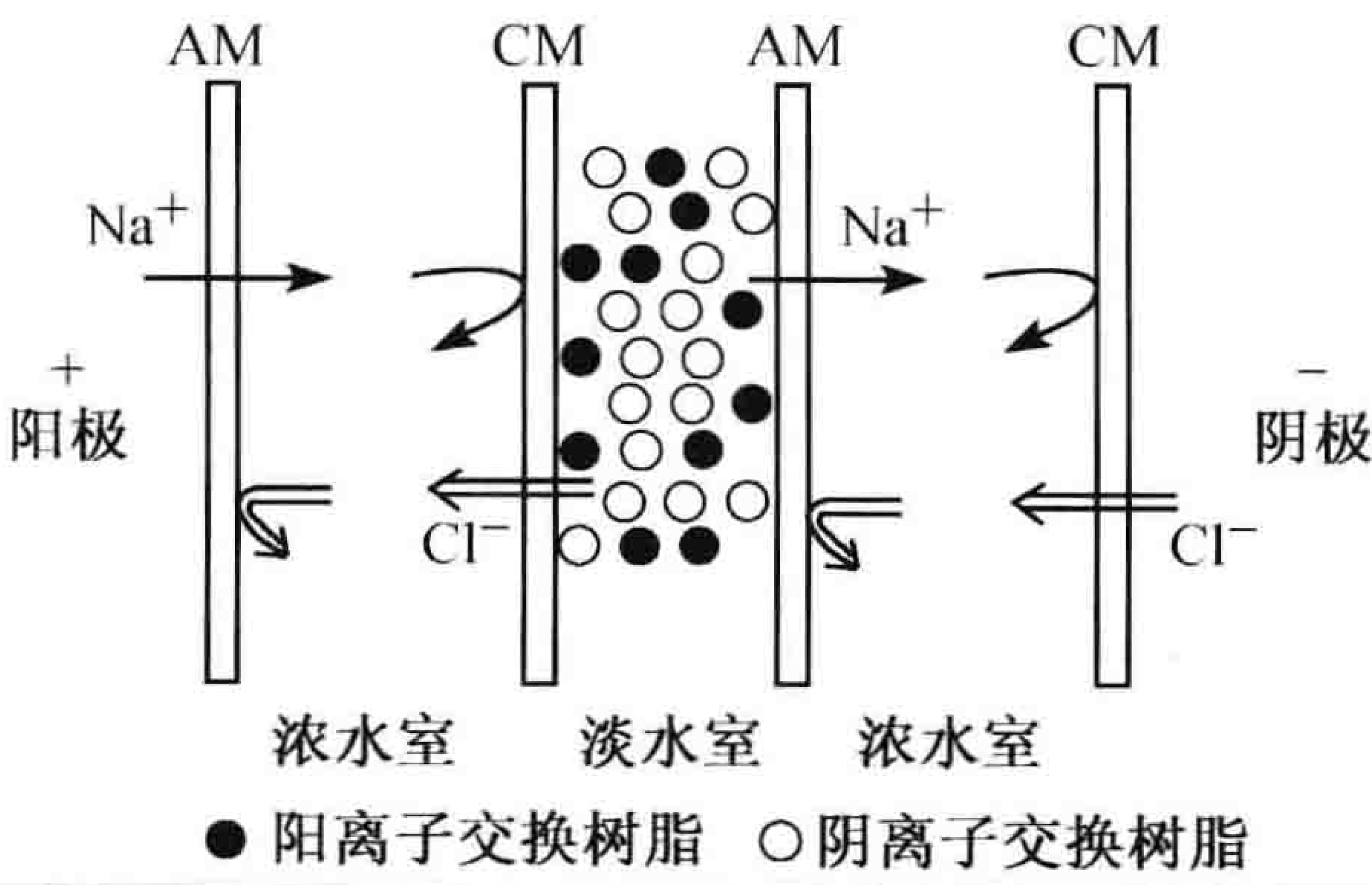


图 8-2　EDI 过程示意图

AM：阴离子交换膜；CM：阳离子交换膜

EDI 是在电渗析的基础上发展起来的，与电渗析不同的是，EDI 在除盐室中充满了离子交换树脂珠（图 8-2）。交换反应在模块的纯化室中进行，在那里阴离子交换树脂用 OH^- 来交换溶解盐中的阴离子。相应地，阳离子交换树脂用 H^+ 来交换溶解盐中的阳离子。在位于模块两端的阳极和阴极之间加一直流电场，电势就使交换到树脂上的离子沿着树脂粒的表面迁移并通过膜进入浓缩室。阳极吸引阴离子，阴离子通过阴离子膜进入

相邻的浓水流却被阳离子选择膜阻隔，从而留在浓水流中。阴极吸引纯水流中的阳离子通过阳离子交换膜，进入相临的浓水流却被阴离子膜阻隔，从而留在浓水流中。当水流过这两种平行的室时，离子在纯水室被除去并在相临的浓水流中聚积，然后由浓水流将其从模块中带走。在纯水室的离子交换树脂中，即在电势差高的局部区域发生电化学反应分解的水产生大量的 H^+ 和 OH^-。在混床离子交换树脂中局部 H^+ 和 OH^- 的产生使树脂和膜不需要添加化学药品就可以持续再生。使 EDI 处于最佳工作状态、不出故障的基本要求就是对 EDI 按照要求进行适当的预处理，因为进水中的杂质对去离子模块有很大影响，并可能导致模块寿命缩短。

2. EDI 的进水条件

EDI 组件运行结果取决于各种运行条件，以下是保证 EDI 正常运行的最低条件。为了使系统运行效果更佳，系统设计时应适当提高这些条件。

1）给水：RO 纯水，一般水的电导率为 4～30μS/cm。

2）pH：5.0～8.0（在此 pH 条件下，水硬度不能太高）。

3）温度：5～35℃。

4）进水压力：最大为 400kPa，最小为 150kPa。出水压力，浓水和电极水的出口压力必须低于产品水的出口压力。

5）硬度（以 $CaCO_3$ 计）：最大为 1.0mg/L，建议采用 0.1mg/L。

6）有机物：最大为 0.5mg/L。总有机碳（TOC）建议为零。

7）氧化剂：最大为 0.05mg/L（Cl_2），0.02mg/L（O_3），没有臭氧和氯气。

8）变价金属：最大为 0.01mg/L（Fe）。

9）二氧化硅：50～150μg/L。

10）二氧化碳的总量：二氧化碳含量和 pH 将明显影响产品水电阻率。在大于 10mg/L 时一般应在 EDI 设备前安装脱气装置。

3. EDI 的优点

1）不需要酸碱再生。电除盐的操作非常安全，可以简化废水的处理。

2）可连续生产。电除盐的生产是连续的，免除了使用混床过程中复杂的再生操作，减少了很多备用设备。

3）不需要处理废酸碱。没有废酸碱的中和排放处理系统，电除盐的浓水可以直接排放或返回到 RO 的进口（EDI 中浓水量比纯水少得多）。

4）安装条件简单。电除盐在安装时，占地面积小，大部分标准厂房都能满足，对于较低的厂房，可以通过对电除盐模块的水平配置解决。

5）系统设计简单。电除盐的模块设计很容易把它的流量做到 450t/h 甚至更高。

6）运行成本低。电除盐系统与各种混床相比，在价格上有竞争性。

7）实用的设计。对于电除盐系统，不管是维修还是增减设备容量都很容易。必须更换膜堆时，在现场只要花极少的停机时间就可以完成。

8）安装维修简便。电除盐装置允许通过对其他膜堆的流量重新分配而达到对某一

个膜堆维修的要求，不改变系统的性能。

9）水质稳定。电除盐的出水质量稳定，不会像普通混床那样造成水质变化。

10）标准设计。利用标准单元，如同搭积木般的组合，可以满足用户不同产水量的需要。

4. EDI 的缺点

1）这种操作方式下的除盐和水回收能力与 ED 相等。因为离子交换树脂主要作为一种介质滤器并没有任何较好的反冲洗方法，源水中的微粒数必须很少。也就是说，为保证它的正常工作需要增加预处理工序，如超滤和反渗透（RO）。

2）EDI 池的维修较困难。在安装好后，EDI 池里就会装入树脂，但在卸装前并没有有效的办法来把树脂取出。在重新安装前需要把每一部件都洗干净以去除树脂珠。

3）EDI 在水电离模式下工作时，电能和除盐的效率较低。通常只有 10%～20%的直流电流用于移动盐离子。其他的电流都被用来电离水。由于电流效率太低，EDI 实际上只能用于低 TDS（total dissolved solid，溶解性总固体）水，如 TDS 在 100mg/L 以下的反渗透水。

4）除了 TDS 之外，也应该考虑钙在阴离子交换膜内部沉积的可能性。总的来说，Ca^{2+} 浓度应在 0.5mg/L 以下。通常系统在回收率 95%左右的条件下工作。

5）如果水源中二氧化碳的浓度为 5mg/L 以上、钙在 0.5mg/L 以上，就要降低回收率以防止结垢。降低回收率使浓缩室中的钙离子浓度降低，因此也使进入阴离子交换膜的钙离子数减少。

5. 超滤

超滤（简称 UF）是以压力为推动力，利用超滤膜不同孔径对液体进行分离的物理筛分过程。其分子切割量（CWCO）一般为6000 至 50 万，孔径为 100nm。超滤截留的颗粒直径范围是 0.001～5μm，相当于相对分子质量大于 500 的各种微粒、胶体、有机物、细菌、热源等物质，但不能截留无机离子。所过滤的溶液渗透压很小，可以忽略，操作静压力为 1～5atm（1atm＝1.01325×10^5 Pa），所用通常采用非对称膜。

（1）分离特点

1）分离过程无相变化，节约能源。

2）分离是在常温下进行，适合于一些热敏感性物质（如果汁、药品和生物制剂）的浓缩和提纯。

3）系列化的超滤膜，可将多组分的大分子溶液体系实行分子质量分级。

4）设备简单，易于操作、管理和维修。

5）膜在使用过程中，本身无任何碎屑或微粒脱落，保证透过水纯净。

（2）分类

超滤的类别主要以超滤膜为分类标准，用于制取纯化水的超滤材料主要有醋酸纤维膜和聚砜膜。膜元件与组件有平版式、内压管式、卷式、内压中空纤维式。其中，中空纤维式是国内应用最为广泛的一种，其特点是没有膜的支撑物，靠纤维管的本身强度来

承受工作压力。又根据膜的致密层是在中空纤维的内表面或者外表面分为内压式和外压式。现在应用的主要为外压式，主要优点是单位容积内装填的有效膜面积大，且占地面积小。

（六）微孔过滤

微孔过滤又称亚微米过滤，是采用一个 0.2μm 孔径的膜或者中空纤维滤膜，滤除直径范围为 0.02～10μm 的微粒。微孔过滤所用的膜是对称膜，操作压力为 0.1～2atm。在超纯化水系统中，主要用于去除细菌、微量的悬浮颗粒及较大颗粒的胶团。常用于精处理系统的最终过滤环节中，可有效截留树脂碎粒、活细胞及其残骸，也可作为最后处理步骤中超过滤和反渗透器的最终过滤器。微孔滤膜是具有对称微孔毛细管结构的薄膜，微孔密度约为 108 个/cm^2，膜的截留效率高、操作压力低、透水率高，但易堵塞。

超纯化水系统中常用的微孔滤膜种类有混合膜（醋酸纤维与硝化纤维素孔）、聚氟乙烯膜和聚碳酸酯膜等。

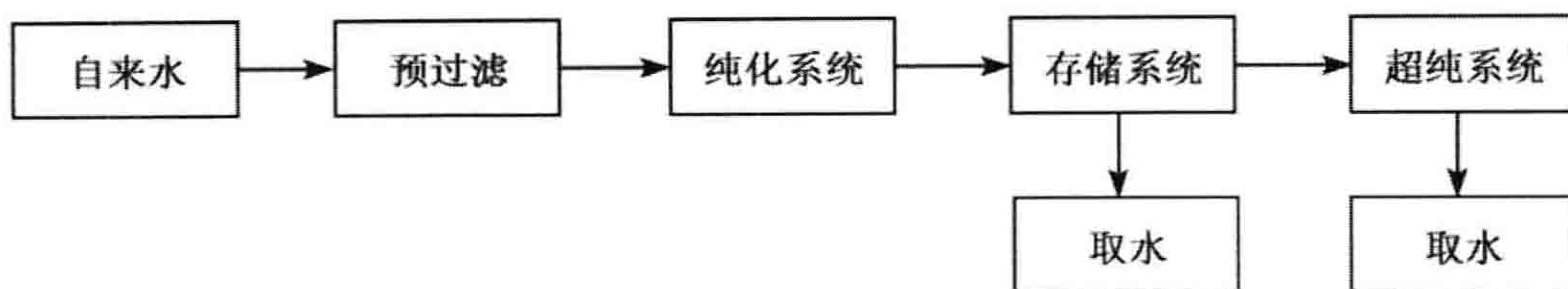
（七）消毒灭菌

通过超滤器或精密过滤器虽然可以去除水中的部分细菌，但却不能抑制细菌的滋生和繁殖，因此必须杀死水中的全部细菌。目前最常用的灭菌方法有紫外线灭菌和臭氧灭菌。紫外线杀菌的特点是：速度快、效率高，不会改变水的物理化学性质，对纯水不会造成附加物所带入的污染，无任何有害化学物质产生，无任何污染。紫外线辐射是一种非电离辐射，穿透力差，表面灼烧强，生物效应和化学效应都很敏感。一般认为紫外线杀菌是体内核酸吸收了紫外线的能量而改变了其自身的结构，进而破坏了核酸的功能所致，当核酸吸收的能量达到致死量且又保持一定的照射时间时，细菌便大量死亡。254nm 是核酸最大吸收波长，可用来除去系统中的细菌。臭氧（O_3）是一种强氧化剂，用于水消毒且不产生二次污染，适应性强（pH5.5～9.5，水温 0～35℃都适应），在水中能除色、除臭、直接杀菌和灭活病毒。与水反应后转成溶解氧存在于水中，使纯水成为高氧水，它是饮用水、纯净水最理想、最受欢迎的消毒剂。

第二节　超纯水器简介

一、超纯水器的系统配置

现以 Millipore 公司的产品 Milli-Q 为例来介绍超纯水器系统（图 8-3）。Millipore 公司是驰名的纯水及超纯水设备制造商，可根据用户的独特要求设计制造出一系列不同的纯水及超纯水系统。其中 Milli-Q 系列更是所有从事化学分析、生化研究及细胞培养所不可或缺的，该系统以反渗透水、蒸馏水、Elix 水或去离子水为源水，可提供符合美国材料试验学会（ASTM）、美国病理学会（CAP）和临床医学会（NCCLS）规定的一级（试剂级）超纯水。Milli-Q 的超纯水的系统配置如下。



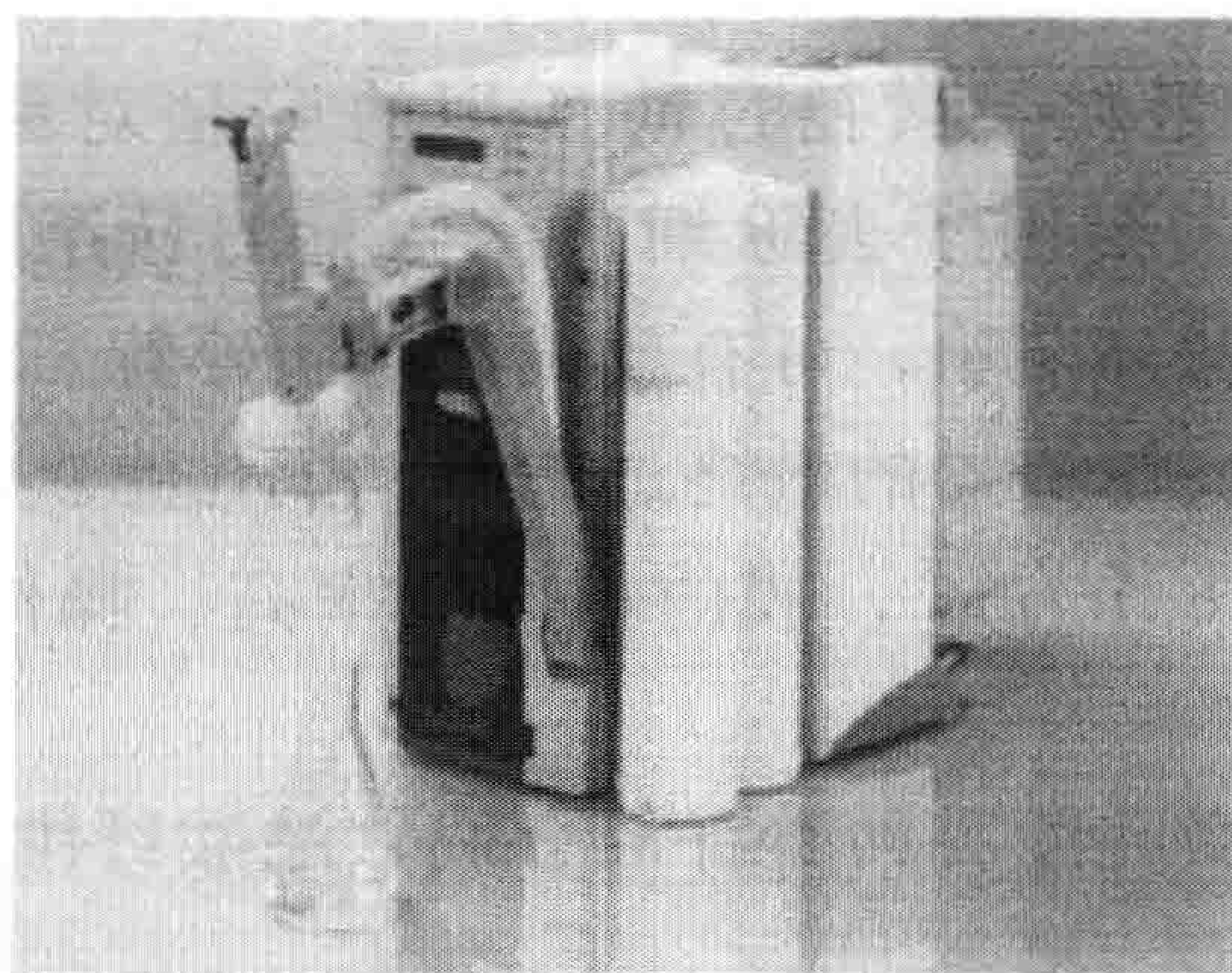


图 8-3　MILLIPORE 自来水进水的超纯水系统 Direct-Q 外观图
来自：http：//www.water-clear.com

(一) 纯水系统

将自来水作初步处理，一般包括预过滤（深层过滤及膜过滤）、渗透或蒸馏。反渗透因其污染物去除率达到 90%～95%，回收率达 20%～40%，效益比传统纯蒸馏法更为理想，因此是 Milli-Q 超纯水系统的理想进水。另外，Millipore 为配合日渐普及的微量分析，研制出 Elix 连续电流去离子系统，结合反渗透及连续电流去离子技术的优点——经济及高效（$R>5\text{M}\Omega$），可用于一般实验室作分析用水。又因其出水质量高，如作为 Milli-Q 的进水，则更能提高 Milli-Q 纯化柱子使用年限及出水水质。

(二) 存储系统

纯化水在一般储水罐中储存会吸收环境中的杂质，使水质变坏。另外，光照也会引起微生物滋生各种杂质，并且微生物会严重影响下游的超纯系统。储水系统能有效改善以上问题，长期保持水质，提高水的质量。

(三) 超纯水系统

将纯水作超纯化处理，出水水质可以达到电阻 18.2MΩ，总有机物 1～10μg/L。配合不同设计的超纯柱，能有效去除水中的热原物质及有机物，适合生化实验室所有高灵敏实验的要求。

二、超纯水器的工作原理及工艺流程

传统的纯水方法不能制备出超纯水。化学意义上纯水（液态的 H_2O）的理论电阻

率为 18.3MΩ·cm，人类生产的纯水是达不到理论值的，但可以达到 18MΩ·cm。现在制备超纯水的方法是将各种纯化水的新技术科学地结合起来，不仅能生产超纯水，而且过程也很简便。目前市售的超纯水器就是一个成功的例子，用自来水作为源水，即可获得超纯水，非常方便，而且使用寿命也较长。

超纯水器制备超纯水的原理和步骤大体如下。

1. 源水

可用自来水、普通蒸馏水或普通去离子水作为源水。

2. 机械过滤

通过砂芯滤板和纤维柱滤除机械杂质，如铁锈和其他悬浮物等。

3. 活性炭过滤

水中的余氯会损害反渗透膜，应力求除尽。活性炭是广谱吸附剂，可吸附气体成分如氯气，也可吸附细菌和某些过渡金属等。

4. 反渗透膜过滤

可滤除 95%以上的电解质和大分子化合物，包括胶体微粒和病毒等。由于绝大多数离子被去除，可大大延长离子交换柱的使用寿命。

5. 紫外线消毒

借助于短波（180～254nm），紫外线照射分解水中的不易被活性炭吸附的小有机化合物，如甲醇、乙醇等，使其转变成二氧化碳和水，以降低 TOC 的指标。

6. 离子交换单元

已知混合离子交换床是除去水中离子的决定性手段。借助于多级混床获得超纯水并不困难，但水的 TOC 指标主要来自树脂床。因此，高质量的离子交换树脂就成为制备超纯水成败的关键。所谓高质量的树脂，即化学稳定性特别好，不分解，不含低聚物、单体和添加剂等的树脂。“核工业级树脂”就属于这一类树脂。

7. 滤膜过滤

利用 0.2μm 滤膜进行过滤，去除水中的颗粒物（小于 0.2μm）达到 1 个/ml。

经过上述各步骤处理后生产出来的水就是超纯水，应该能满足各种仪器分析、高纯分析、痕量分析等的要求，接近或达到电子级水的要求。当然，不同的厂家根据不同的需要，生产超纯水的组合不同，最终所达到的级别也不同。

以美国 B/T 公司的紫外/超滤型超纯水器为例，其工艺流程如图 8-4 所示。图8-4中 1、2、3 柱分别为去离子/蒸馏水/反渗透水预处理柱、超纯混合床柱和超纯/低 TOC 联合处理柱。超纯水器对源水的要求比较高，一般为去离子水，源水在泵的作用下，依次

通过 3 个离子交换柱进行离子交换后，达到去除水中无机盐离子的作用，在柱中间还配有紫外装置，通过离子交换和紫外线处理后，在流路中还安装有一个井池和电导率检测器用于检测其电导率值。如果电导率达到设备的预设值，则设备的指示灯亮，可从图右边的终端过滤器取水；如果在不取水的情况下或者水质处理尚未达到要求时，水会在泵的作用下不断循环处理，直到达到设备设计要求。如果在实验过程中需要使用一些较低要求的水，如冲刷容器等，可从上面的冲刷排水口中取水，仪器则按 FLUSH 键即可。

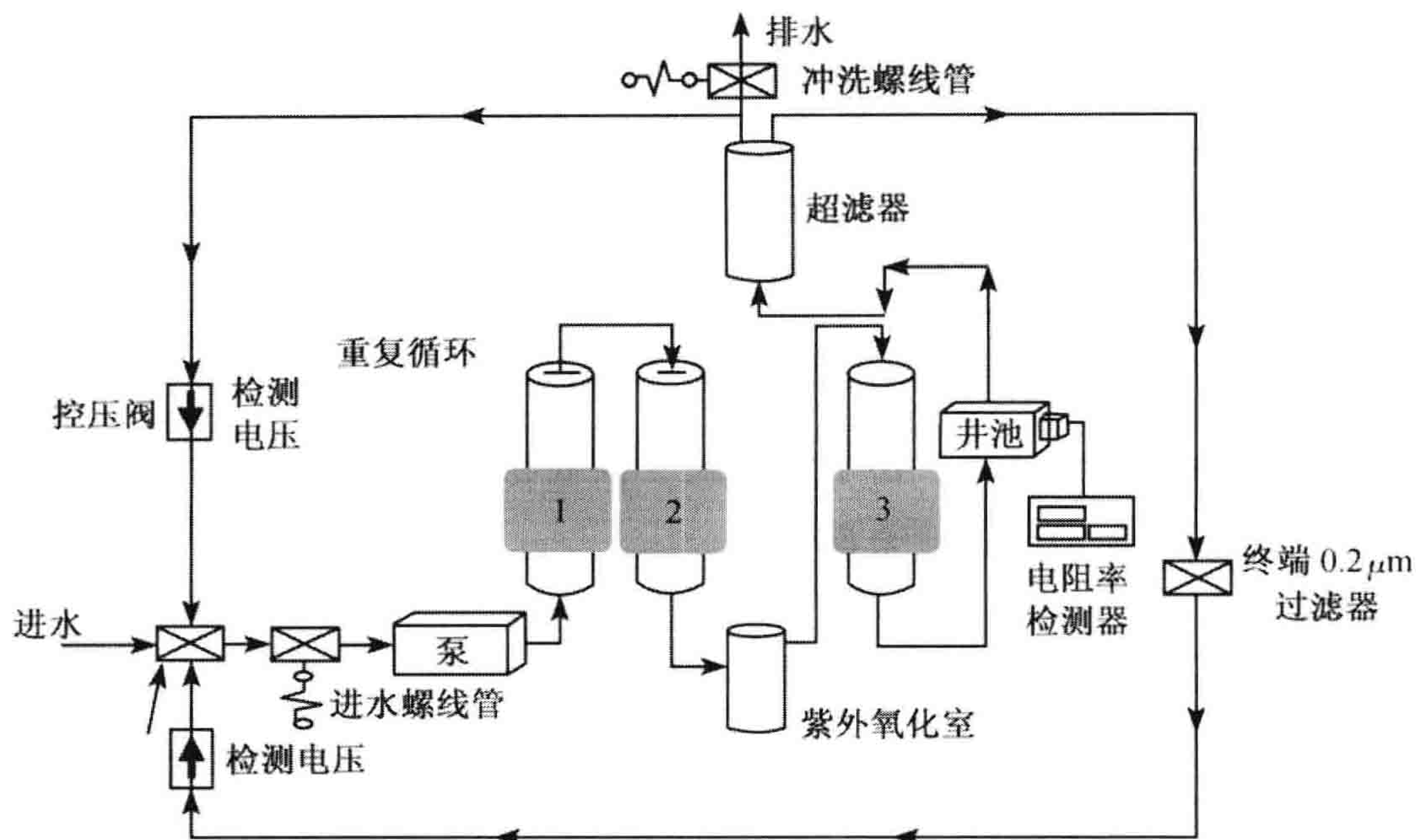


图 8-4　超纯水器的工艺处理流程（UV/UF：ultraviolet/ultrafilter）
来自 Barnstead 公司 NANOpure 超纯水器用户手册

第三节　超纯水器的使用

一、常见故障排除

1）抽水泵不工作，控制面板无显示，整个超纯水器对操作指令不响应。其原因可能是电源接触不良或者保险丝熔断。分别检查电源插头与插座以及保险丝，更换相应部件即可排除故障。

2）抽水泵可以工作，但是控制面板无显示。其原因可能是印制电路板的保险丝熔断或者电路板内部断路。分别检查保险丝和电路板，若为保险丝熔断，更换保险丝即可；若为电路板内部断路，重新连接导线即可排除故障。

3）从远端取水枪中流出的水量减少或枪头不出水。其原因可能是终端微孔过滤器被阻塞。按照使用说明书更换该过滤器即可排除故障。

4）滤毒罐泄漏。其原因可能是滤毒罐密封圈丢失、破损或者放置不当，也可能是滤毒罐没有拧紧所致。更换并正确放置密封圈或拧紧罐口即可排除故障。

5）抽水泵不工作但控制面板可以显示。其原因可能是位于蓄水罐中的泵压力保护

装置或进水管压力切换开关连线未插到顶盖内的插座上，或跳线插头未与泵相连。解决方法为，确保跳线插头已安装，打开进水管，向蓄水罐中注入水，将泵的保护装置或压力开关的连线与顶盖内侧的插座相连，若在进水管中安装有压力感应开关，则压力需要达到一定数值方能启动抽水泵。

6）循环水无法达到所需纯度。其原因比较复杂，可能是：①水质处理柱损耗，需要更换针头；②水质处理柱安装顺序错误，需要根据初始状态按照一定顺序重新安装水质处理柱；③水质处理柱上下倒置，需要按照初始状态重新安装；④进水通过水质处理柱，这需要确保水质处理柱中的密封圈完好无损且安装正确；⑤阀门功能失调，解决方法需开启仪器，若有水从安检阀门后部渗出，则需清洗，去除杂质。

7）进行电阻检测时控制面板显示“错误”。其原因可能是：①电导池连接错误或导线连接不当，需要检查电导池导线连接情况；②系统中含有气体，可打开远程出水枪或超纯水排水口，以便排空空气；③系统的电子线路或部件没有校准，需要检测参比池的电阻，如果不在9.7～10.3MΩ，则需要重新校准，如果参比池电阻正常，清洁电导池后重新安装，若不能排除故障，则需要更换电导池。

8）控制面板显示“E _ A”。原因为系统电子线路故障，需要更换PC主板。

二、超纯水器的维护保养

（一）系统清洁

系统清洁的频率与所用源水的质量有关，较难确定，但当需要更换水质处理柱时，则需要进行系统清洁。

（二）清洁电导池

首先关闭仪器，拔除电源，关闭进水阀门，平衡系统压力。卸下顶盖螺丝，打开顶盖，取出电导池并卸下密封圈。用温和洗涤剂或10%无机盐溶液洗涤电导池，可选择超声波清洗或用刷子清洗，再用清水反复冲洗。清洗完毕后，检查密封圈，如有必要可以更换，将电导池重新安装并拧紧。重新安装好电源微处理器电路板和超滤装置后，连接好阀门，安装好顶盖。

（三）仪器搁置注意事项

若较长时间不使用超纯水器，需先进行彻底清洁，并取出水质处理柱、超滤器和终端过滤器，防止细菌的滋生。若仪器注满水后长期未使用，需要将系统进行清洁，更换水质处理柱和终端过滤器方可继续使用。

此外，超纯水装置的使用过程中，还需要注意以下几个问题：

1）超纯水的储存时间不宜过长，一般为1周左右，长时间搁置会有微生物繁殖。

2）在超纯水储存过程中，玻璃容器中的硅、钙离子或塑料容器中的有机物可能渗入水中，尽管这些杂质的量极其微小，但有时也会给实验带来影响。

第四节　超纯水的应用

一、超纯水的基本应用

一般公司生产的超纯水均可以在以下领域使用：高效液相色谱、离子色谱、原子吸收光谱、原子发射光谱、质谱分析仪、氨基酸分析、聚合酶链反应（PCR）应用及分析、气相色谱分析仪、精密仪器分析、高精密光学镜片冲洗和分析试剂及药品配制、稀释等。

二、超低有机物型的超纯水

有机物含量极低的超纯水可以应用在下列领域：高效液相色谱、离子色谱、气相色谱、气-质联用、总有机碳分析、有机物分析、毛细管电泳、微电子部件的冲洗、毒理学研究和环保实验分析等。

三、超强组合型的超纯水

采用超强组合生产出来的接近理论纯水的超纯水适合在下列领域使用：环境分析实验、物理学、电化学及界面研究、毒理学研究、各种高精度仪器分析、精密分析标准品、试剂、分子生物学及生命科学、试管婴儿、组织培养、动物细胞及植物细胞培养、氨基酸分析和双向电泳等。

第五节　超纯水器的发展趋势

目前，由于超纯水装置已经在许多行业、许多领域得到了广泛的应用，不仅是生物学、化学等科研实验用水的最佳选择，也在食品、卫生等领域发挥作用，因此各大超纯水器的生产厂家也致力于新型超纯水器的研发，力图研制出能够生产更高纯度、应用范围更广的产品。就产品趋势而言，主要有两大趋势：一是进行水处理工艺的重新组合，更加合理地安排各道工序，确保生产出来的水纯度最高；二是为了克服源水水压低等一些不利因素，对装置的硬件设备进行改进，采用一些新技术，研制出克服这些困难的新型超纯水装置。现举例说明这两大趋势。

在超纯水装置生产超纯水的过程中，基本上可以分为预处理、主处理、后处理三步。预处理中常用处理工艺包括微孔过滤、活性炭吸附等；主处理为生产过程的核心工序，要进一步去除常规处理和预处理难以去除的小分子有机物等杂质，使用较多的是反渗透、精密微孔过滤、硅藻土过滤、活性炭过滤、离子交换等；后处理的主要目的为消毒、杀菌，多采用紫外线消毒等。由于一种工艺很难达到超纯水所需纯度，因此在流程选择时，除需要考虑预处理、主处理、后处理工艺的有机配合，共同去除、层层设防外，在每一步处理过程中也需要多种工艺配合，多级串联。例如，在后处理中，紫外线与超滤结合、静电紫外结合、臭氧超滤结合等。由此可见，在工艺流程上不断创新，设

计新的、更加可靠的工艺组合已经成为目前超纯水装置发展的一个趋势。

另外，由于超纯水装置的广泛使用，需要适应不同地区的特定环境，例如，严重缺水地区，水压不稳，不能利用常规超纯水装置生产纯净水等特殊情况。目前已经研制出利用反渗透器旁路加压技术产水的超纯水装置，克服了这一难题。反渗透器迫使水通过半透膜除去90%的盐分和99%的细胞、颗粒以及溶解在水中的有机物质，但如果源水水压不足，低于控制压力时，反渗透器则不能运行。这样，在反渗透器进口处，加接两个阀及一条连接至反渗透器药筒的塑料管，利用反渗透器的清洗泵进行加压（即反渗透器旁路加压法），不仅解决了水压低、水压不稳情况下无法正常产出超纯水的问题，而且还更加节水、省电，并延长了渗透膜的工作寿命。这只是新技术运用的一个例子，但由此可见对超纯水装置硬件设备的改造和重新设计也是该类仪器发展的一大趋势。

主要参考文献

纪任旺，范瑾初．1996．集团净水器及优质水之我见．城市公共事业，10（3）：18～20

王淑庆，严宝霞．1995．运用反渗透技术制备高纯度注射用水．中国医院药学杂志，15（12）：562～563

魏兴祥，陈迪藩．1996．反渗透器旁路加压产水法．半导体技术，（6）：47～48

杨显丽．2003．反渗透水处理技术在我厂的应用．工业水处理，23（1）：77～78

张维铭．2003．现代分子生物学实验手册．北京：科学出版社．21～23

朱世云，张全兴，孙载坚．1998．超纯水制造中离子交换技术的进展．水处理技术，（2）：11～15

第四篇　材料培养和处理设备

在生物实验过程中，需要进行大量的生物培养工作，如微生物的发酵培养和植物愈伤组织的培养等。用于培养工作的仪器统称为材料培养设备，主要包括摇床、二氧化碳培养箱、人工气候箱、生物反应器等。其中摇床用于液体培养基的微生物振荡培养，是实验室内常用的材料培养设备之一。二氧化碳培养箱用途较为广泛，可进行组织、细胞、细菌的培养。人工气候箱则用于植物种子发芽、育苗、植物周期栽培、微生物培养、昆虫和小动物的饲养等实验。实验室型生物反应器主要用于研究生物反应过程中的规律和一些特殊生物材料的获得，如动植物细胞和微藻的培养。

生物材料与其他材料相比有其特殊性，在加工、保存等过程中一个重要的原则，即保持其生物学活性，尤其是在蛋白质、多糖、核酸等生物大分子的制备过程中，为了提取这些生物大分子，首先要对生物材料进行预处理，如破碎、去杂质等，进行保存的时候，为了保持其生物学活性，需要采取冷冻、冻干等方式进行保存。本篇除了对上述常规的生物学培养设备进行介绍外，还将详细介绍生物材料处理设备超声波破碎仪和冷冻干燥机。此外，由于在培养和处理的操作过程中，经常需要无菌条件，因此超净工作台也将在本篇中进行介绍。

第九章　超声波破碎仪

生物大分子如核酸和蛋白质，是基因工程和蛋白质工程涉及的主要物质，一般通过生物学手段进行分离和提纯。分离的首要步骤就是细胞破碎。细胞破碎的方法较多，物理法包括超声波法、匀浆法、液氮破碎法、三氧化二铝粉研磨法等，其中最常用的方法为超声波破碎法。

目前实验室中进行超声波破碎的仪器为超声波破碎仪，该类仪器是一种加速化学、生物学、物理学的反应速度和加速液体脱气的装置，可用于粉碎动植物细胞、细菌、芽孢和组织。超声波破碎仪能配制近乎 0.01μm 大小的针状体，匀化难混溶的混合液；聚合、析出一些物质；实现提取、粉碎、乳化、匀化、晶化及在电子显微镜下配置各种生物样品的功能，其外观如图 9-1 所示。



图 9-1　美国 SONICS&MATERIAL 公司超声波破碎仪 VCX500
（来自 www.bio-equip.com）

第一节　实验仪器

一、组成结构

超声波破碎仪由超声波发生器和换能器两部分组成。超声波发生器将 50Hz 220V 电压变成 20kHz 做伸缩弹性形变。换能器随之做机械振动，振动波通过浸入在生物溶液中的钛合金变幅杆产生空穴效应（参见第一章“超声清洗仪”的基本原理），激发介质中的生物微粒做机械振动。

二、不同型号仪器的性能特点

（一）S-250D 型超声波细胞破碎仪

该型号仪器为美国 BRANSON（必能信）公司的产品，采用高能高效换能器、高效钛合金探头和可靠精确的发生器，主要用于细胞破碎、样品溶液均质、乳化、崩解和分散、混合、加速反应、脱气、筛分、小孔清洗等，广泛应用于生物、医学、化学、生物制品、药品、食品、化妆品等实验室基础研究及企业生产。

（二）VCX500 型超声波破碎仪

该型号仪器为美国 SONICS&MATERIAL 公司的产品。该公司是世界上颇具盛名的超声波破碎仪厂家，其产品广泛应用于样品制备、细胞裂解、解聚、匀化处理、降低

微粒大小、土壤测试、加速化学反应、去除泡沫和使破碎物原子化等领域。该型号仪器采用程序化设计，可储存 10 组程序；全自动调节探头，并可接温度探头进行温度控制；还可选择不同操作容量的超声探头。

第二节　使 用 操 作

一、操 作 步 骤

1）将 ON/OFF 开关置于 ON 位置。屏幕即显示以下内容：

TIME _ : _ : _	**TEMP** _ _ ℃
PULSE _ 。_ 。_	**AMPL** _ _ %

2）利用数字键盘输入时间、温度、脉冲值（pulse）和振幅百分比设定值，然后按 ENTER 键进行确认。

3）按下 SAVE 键可以显示和修改设定条件；按 ENTER/REVIEW 键进行浏览和储存；按 RECALL 键可以通过输入 ID 号码调出储存的处理条件。

4）按下 START 键，或者脚踩脚控开关（ START 键和脚控开关是相互排斥的，当任意一个键启动后，另一个则不起作用），即可开始进行破碎。

二、仪器的维护保养

1）使用过程中需要旋紧探头、可活动针头（replaceable tip）和微型针头，以保证安全。

2）安装和检查保险丝，需要严格按照说明书步骤进行。

3）将 AMPLITUDE 振幅设置为 50，ON/OFF 开关置于 ON 位置，将探头和微型针头置于空气中（不要插入样品中），瓦特计读数应该低于 20W。如果读数超过 20W，将 ON/OFF 开关置于 OFF 位置，从换能器上卸下探头。

4）将 ON/OFF 电源开关置于 ON 位置，如果瓦特计读数低于 20W，探针和微型针头即有可能损坏，需要更换。如果读数超过 20W，就有可能是换能器或者电源有问题，就需要全面检修。

5）温度探头的校准。

a. 取 500ml 各占 50%的冰水混合物，放置 5min；

b. 取 500ml 保持沸腾的水；

c. 将温度探头牢牢插入仪器后盖的插孔中；

d. 按住 TEMP 键，将 ON/OFF 开关置于 ON 位置；

e. 将温度探头插入冰水中 40s。将低温自动校准完成后，液晶显示屏将显示将温度探头放入沸水中；

f. 将温度探头插入沸水中保持 40s。当高温校准完成后，液晶显示屏上即显示温度探头校准完毕。

第三节　应　　用

一、生物材料破碎

为了从细胞中提取核酸、蛋白质、糖类、脂类、无机离子、维生素、色素等物质，首先必须破碎细胞壁和原生质膜，这一过程目前多依赖于超声波破碎仪，可以对微生物细胞、动植物细胞和其他一些生物材料进行破碎。不同的微生物对超声波破碎的敏感性不同，例如，最容易破碎的微生物为杆菌，而球菌对超声波的忍耐性较强，分支杆菌组就难以用超声波破碎法进行破碎。一般来讲动物细胞比植物细胞容易用超声波进行破碎，红细胞比肌肉细胞容易破碎。对于不容易破碎的细胞，可以采用加入玻璃珠或加入溶菌酶进行预处理等方法帮助破碎。对于皮肤和软骨使用胶原酶、肝脏和肾脏使用胰岛素透明质酸酶进行预处理，都有助于破碎。

二、提取花粉管中可溶性蛋白质

目前，如何分离花粉（管）*S*基因产物已成为自交不亲和性分子机制研究的一个关键。以石英砂和液氮研磨法提取花粉管蛋白质，其设备简单，操作容易，但由于研磨过程中受人为因素的影响较多，实验结果可重复性差。可利用超声波液提法提取沙田柚花粉管蛋白质，通过设计一系列的工作参数，选择出破碎效果较理想的一组参数，尽可能在破碎花粉管的同时保持花粉粒的完整。超声波法与常规的石英砂研磨法相比在很大程度上消除了不必要因素的干扰，同时还省去在破碎过程中需要不断镜检的麻烦，且提取效率有明显的提高，最重要的是所提取的蛋白质种类较稳定，实验重复性好。因此，利用超声波破碎仪分离花粉管和花粉粒，再分别提取其可溶性蛋白质的方法具有实用价值，值得推广。

三、原生质体诱变

20世纪70年代以来，原生质体技术的发展给工业微生物育种提供了新的途径，原生质体融合已发展为成熟规范的实验室诱变育种方法。原生质体融合需要不同基因型且各具优势的两种亲本菌株，并且亲代需要具有明确的遗传标记，而工业化生产中往往不具备这些条件。在这种情况下，原生质体再生诱变不失为一种合适的选择。原生质体再生诱变法即脱去菌株的细胞壁后，直接在再生培养基上培养，这种方法不仅是简单的细胞壁的脱去和再生的过程，而是一种新兴的菌种诱变法。因为在脱壁和再生的过程中，裸露的原生质体对外界的物理、化学信号极为敏感；同时，细胞经过胞壁再生，代谢过程也会发生改变，突变率较高。为了获得某菌株的原生质体，可以使用超声波破碎仪破坏原菌株的细胞壁，具有操作简便、成本低廉、实验可控制性好、再生率高等优点。

主要参考文献

黄德中．2002．超声波技术在机械工程中的利用现状与最新发展．振动与冲击，(3)：74～76
李惠敏，秦新民，覃屏生等．2004．超声波提取沙田柚花粉管可溶性蛋白的初步研究．广西师范大学

学报（自然科学版），22（1）：82～86

陆明，祁汝峰，徐培君等．2001．超声波破碎法在原生质体诱变中的运用．苏州医学院学报，21（4）：417～419

Hiroshi H，Ueha S．1995．Design of a Traveling Wave Type Ultrasonic Motor．IEEE Transactions on Ultraonics．Ferro-electronics and Frequency Control，42（2）：225～231

Hopwood D A，Bibb M J，Chater K F．1985．Genetic manipulation of streptomyces，A laboratory Manual，Norwich England．The John Innes Foundation．46～49

Kinghorn J R，Uncles S E．1994．Molecular Genetics and Expression of Foreign Proteins in the Genus Aspergillus．Biotech Handbook7．Aspergillus．edt．by Smith J E．Plenum Press NY．60～65

第十章　细胞电穿孔仪和电融合仪

电穿孔和电融合是近十几年内发展的两个纯物理性的生物技术，由于高速发展的其他生物技术多需要细胞装载和融合，所以这两种技术就有了很大的应用价值。电穿孔和电融合在细菌和动植物细胞的范围内进行应用，且在遗传学、免疫学和细胞生物学中应用广泛，可称之为 20 世纪 80 年代生物物理学的一大成就。目前，美国、日本等国已研制生产出多种细胞电穿孔、电融合仪，促进了这些国家细胞工程研究的开展。图 10-1 显示了一种细胞穿孔融合仪及相关配件。



图 10-1　美国 BTX 公司细胞电穿孔、电融合仪及配件

配件包括：电极（普通电极、镊子电极、两头针电极、钳电极、8/96 孔电极、35mm 电极）、承物玻璃器、修正槽、扁平电极槽、培养皿、样品杯、无逆流系统（来自 www.bio-equip.com）

第一节　基本原理和影响效率的因素

一、基本原理

（一）电穿孔仪的基本原理

外加电场之所以能够击穿细胞膜，主要是因为细胞膜基本上是一个绝缘体，膜两侧浸在含离子的电解质溶液中，当外加电场时，引起膜两边的电解质离子极化，形成了外加的膜电位差，这个电位差的形成时间常数由膜的等效电容充电时间来决定。高压电脉冲击穿细胞膜后，如果脉冲的宽度在数百微秒内，磷脂双分子层和细胞膜均可在穿孔后复原，这一机制至今仍在模型和理论阶段，细胞膜的复原不但与脂肪分子的排列和相互间引力有关，还与其他重要因素有关，如胶体渗透作用、溶液离子作用和膜蛋白的影响等。

电穿孔并非细胞穿孔的唯一方法，还有传统的磷酸钙沉淀法、激光钻孔法和微射弹法。但和磷酸钙法相比电脉冲法有其独特的特点：操作简单，较易重复，电参数也较容易控制；和其他高技术方法相比，电脉冲法所需仪器设备简单，在普通实验室即可制作。电脉冲法可应用于许多种细胞，例如，有坚强的外膜的细菌和有细胞膜的动物细胞都可用合适的脉冲时间常数和电场强度来击穿。此法也适用于悬浮培养的细胞，不像磷酸钙法仅局限于贴壁培养或沉淀后的细胞。此外，电脉冲法可以应用于极少量的细胞，如果在显微镜下采用微电极，只需几百个细胞就可以进行操作。

（二）电融合仪的基本原理

电场诱导细胞融合的程序分为两步，首先通过非均匀电场的电介质电泳作用建立细胞（原生质体）间的紧密接触，使之形成细胞串；再利用高压脉冲的可逆击穿效应使接触区质膜上形成微孔，胞质通过微孔融合。

非均匀电场用平行排列的两根圆柱形电极来产生。电场需采用频率大于 0.3MHz 的交流电场，以避免直流电场的有害电解作用。交流电场应有一定的强度，才能保证细胞串的稳定形成。电场的聚集力正比于细胞的体积，为获得同样的聚集效果，体积小的细胞需要较大的场强。不同生物细胞（原生质体）的大小相差很大，为使融合装置具有较广的适用范围，其输出最大场强不低于 1000V/cm。以电极间距 0.5mm 计算，融合装置的最大输出交流电压应达到（1000V/cm）×(0.05cm)＝50V。

为击穿细胞膜而引起融合所需的脉冲强度是细胞直径的函数，细胞越小所需脉冲场强越大。场强又与电极间距成反比，缩小电极间距可在同样电压下获得更大的场强。为保证可逆电击穿，脉冲时程范围应小于 100μs。

融合装置的负载是加有介质溶液的电极室，其阻抗同介质溶液电导率、交流电场频率以及电极室电容有关。为了不使输出电压再加上负载后跌落过多，融合装置输出内阻应显著小于电极室阻抗。电诱导细胞融合仪电路框图如图 10-2 所示。

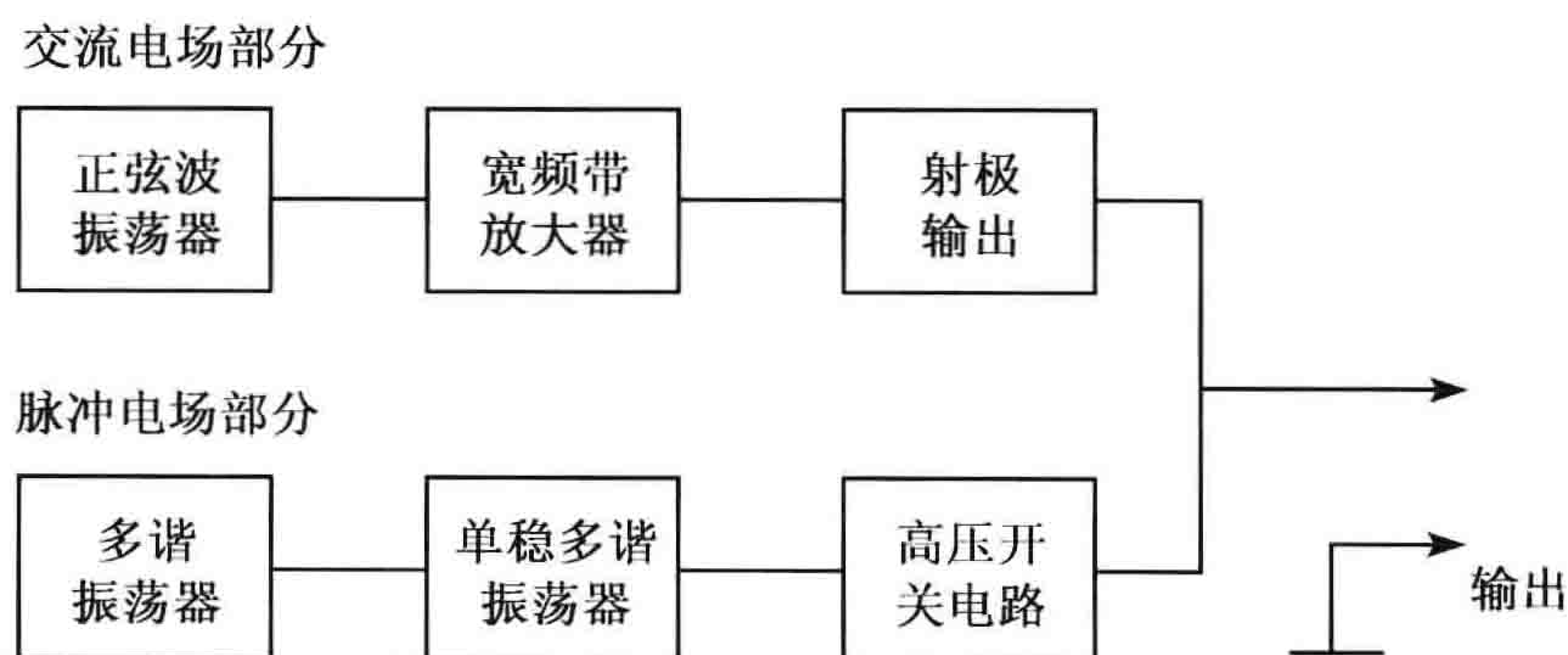


图 10-2　电诱导细胞融合仪电路框图

电融合也非细胞融合的唯一途径，还有聚乙二醇融合法和病毒融合法。因为电参数很容易精确控制，所以电融合比其他化学及生物融合法容易控制。电融合为物理技术，没有化学药品或病毒的污染，可以免去细胞融合后的洗涤程序，该方法也可以广泛应用于多种细胞。

二、影响电穿孔仪和电融合仪效率的因素

（一）电脉冲的幅度、时间和脉冲波形

使细胞膜不稳定而被击破的最低电压称为临界电压。大致上 1～4kV/cm 的电场，加在半径为 10μm 的动物细胞上，即可产生膜的临界电压。植物细胞必须先把细胞壁去掉，剩下的原生质体的穿孔和融合所需电压与动物细胞相近；细菌的外膜相当强韧，所需临界电压也往往比普通动物细胞高 1～2 个数量级。脉冲的幅度只是要求条件之一，脉冲的宽度也必须比膜的充电时间和膜的弹性复原时间长，这样才能保证孔道在脉冲以后有机会继续开放一段时间。一般来说，宽度窄的脉冲，需要高幅度来弥补。太宽的脉冲往往会击破融合区外的细胞膜，导致细胞死亡，交流脉冲或多次脉冲能够充分利用脉冲电场的相向电泳压力，所以往往比单个直流（方形）脉冲有效。如果穿孔用的电脉冲，在以峰电压击破细胞膜后能以较低的电压维持孔道的短时间开放，则对提高穿孔效率有益，因此指数衰减的脉冲往往比同能量的方形脉冲有效。专门设计的脉冲形也许会比指数衰减形更有效，但指数衰减波形的脉冲最易制造，所以用途最广。

（二）胶体渗透压和细胞膨胀

细胞被脉冲击穿之后，水和一些离子可以自由进入，但大分子却不易通过击穿的小孔。由于渗透压的不平衡，水、部分离子和小分子会进入细胞，导致细胞继续膨胀而破裂。除非细胞膜在破裂前就复原。为避免细胞破裂，往往需要在细胞外的缓冲液加入大分子以维持渗透压平衡。

在很多情况下，允许细胞稍微膨胀，会有助于引导药物和分子进入细胞，当水或缓冲液进入细胞时，会把孔道扩大，同时溶解在外液中的成分会随水流被带进细胞。所以一般在穿孔之前，把细胞放入稍低渗透压的缓冲液中，让细胞略微膨胀，细胞膜的张力也因而增高，横向张力可以帮助电压力穿破细胞膜。已有张力的膜很容易扩大，若用于电融合过程，初成的连接孔道也会较容易开扩，因而促成融合。

在转染过程中，若需长链的 DNA 或质粒进入细胞，从理论上讲，需要很长时间，但由于细胞电穿孔后的复原时间仅几十分钟，即使电穿孔足够大，也不可能完成这一过程。但在实验过程中，电穿孔的转染效率比预期高很多。

（三）细胞膜的复原

穿孔后细胞膜复原的时间和过程随细胞而异，时间的长短也由复原期间的温度、外液的渗透压、所含离子和药物来决定。细胞膜复原的时间长些，有利于细胞外药物的扩散进入细胞内。对于有些操作过程，需要低温来延缓复原时间。但在复原过程中，细胞膜仍然是有漏洞的，所以内外的胶体渗透压必须仔细调节。在这段时间内，细胞仍然非常脆弱，所以应该避免机械振荡，尽量避免使用移液管或离心操作。细胞外液所含的离子，一方面影响细胞复原期间的细胞生存，另一方面也影响细胞膜复原的速度。

以上几个最普通的因素，互相之间也有影响，例如，脉冲的强度和宽度大，孔也越

来越多，药物进入快，融合的概率也高，但细胞对胶体渗透压和离子平衡也敏感。因此无论穿孔或融合的效率，在脉冲电压或宽度继续增高的条件下，往往会先达最高效率峰，然后急剧下降，原因就在于细胞死亡。最佳效率的条件是由多种因素匹配决定的，如果了解生物物理的原理，熟悉细胞的特性，就可以设计出适当的仪器和程序，进行电穿孔和电融合。

第二节　细胞穿孔仪

一、实验仪器

电穿孔仪比较简单，尤其是因为指数衰减的电脉冲比较适宜于穿孔，通常只要一个电容放电器就可以产生所需的脉冲。仪器内的电容量、充电电压和调节用电阻值由细胞样本来决定。如果细胞是悬浮培养的，或者可以从贴附生长细胞悬浮下来的，甚至贴在塑料珠上培养的细胞都可以连液体放入光谱仪用的测量杯内，在测量杯相对的两侧壁插入不锈钢或金、铂的电极，然后加上另一电极即可。电极间距离近些，可用较低的电压达到同样高的电场，对用少量细胞的实验来说，这无疑是一个优越条件。一般商业产品的设计大同小异。

二、不同型号仪器的性能特点

（一）Gene Pulser II 电穿孔仪

该仪器为伯乐公司产品，其系统工作需要 Gene Pulser II 核心主件和可供选择的三种模块共同完成，用户可以根据实验室的需要来选择不同的组件，用于原核和真核细胞的转染。其中脉冲增强控制器模块用于细菌和酵母的转化，能提供高电阻控制，有效地转移任何大小或复杂度不同的 DNA 或蛋白质，同时提供最大限度的样品保护功能；电容扩充器模块用于哺乳动物细胞、胚胎细胞或植物原生质体的击穿，也具有广泛、精确的电容（达到 3275μF），从而确保用更大的电容进行低电压转化最敏感的真核细胞或其他细胞；RF 模块与核心主件连用时可输出 Bio-Rad 专利的脉冲，称 Flexwave 技术，此技术有利于保持转化时细胞的高存活率。此外，该仪器采用先进的电路系统设计，可通过严格的电容、电阻和电压控制来实现精确的脉冲传输，系统的弧光保护可以避免仪器损伤，每个模块有独特的连接电缆，防止错误连线。

（二）Multiporator 多功能细胞电穿孔仪

该仪器为德国 Eppendorf 公司产品，采用特有的软脉冲技术，提供非常短的脉冲，减少对细胞的损伤，提高细胞存活率。专利的电脉冲放电技术，使放电过程不受样品电阻影响，保障了结果的可靠性和可重复性。低渗、无钠缓冲液可使细胞变形而更易穿透，且能稳定 Na^+/K^+ 浓度，提高转染效率。可应用于动物及人类细胞系、胚胎干细胞、原代细胞、卵母细胞和植物细胞的转染。选配原核模块和融合模块可应用于原核细胞转化和细胞融合。

三、工作程序与使用方法

电穿孔仪的一般工作过程是，先把细胞洗净，浸在无菌的穿孔用的低钠、低钙的缓冲液中，在超净工作台上加入需要输入细胞内的药物（蛋白质、DNA、质粒或药剂等），然后放入已消毒的穿孔样品室内，样品的电阻值可以用低压交流电预测，调节放电器，使之达到事先算出的所需充电电压和衰减时间，而后充电、放电即可。下面以原生质体制备和融合操作为例进行说明。

选择实验材料，用溶菌酶分离原生质体。将离心提纯的原生质体用 0.6mol 甘露醇稳渗剂调整到 10^6 个/ml，注入电极间距为 0.2mm 的电极室内。先施加交流电场 1min，形成稳定的细胞串后，将电场强度降至原来的 1/10 后施加高压脉冲 5 次（间隔 1s）。在倒置显微镜下观察各电参数的改变对细胞串形成及融合过程的影响，用示波器测量各电参数。融合率＝(视野内融合原生质体数/视野内原生质体的成对数)×100%，观察 5 个视野取其平均。对经电场处理的原生质体进行再生培养，以了解电场处理对再生率的影响。

第三节　细胞电融合仪

一、实验仪器与操作过程

电融合所需的条件和电穿孔很相似，不同点在于电融合脉冲起作用时，融合的细胞必须相互紧接；电融合所使用的脉冲比单细胞穿孔用的脉冲短，电场强度偏低。

电融合前促使细胞相互紧接可使用 Zimmermann 式的电融合仪器。用一个不均匀的电场产生电介质电泳力来使细胞相互连接呈串珠状，这个电场可以用两条平行的铂丝，或者用两块平板金属电极产生，甚至也可以用金属挥发沉积在透明的绝缘体上形成。细胞放在电极中间，受到不均匀的交流电场的影响，就会相互吸引，沿着电力线方向排成串珠。在电融合的过程中，把悬浮在融合液的细胞加进两电极之间，加上电介质电泳的交流电场，或开动离心机至一定速度后，约 0.5min 左右即可加 1～5 次脉冲。如果用透明的样品室，细胞的串珠和融合可在显微镜下观察。细胞膜在加了脉冲后的几分钟内非常脆弱，所以应尽量避免移动，待加脉冲 10min 后，加入复原液（生理盐水加 10%牛血清）在 37℃培养 15min 后，再取出分别培养。

二、不同型号仪器的性能特点

（一）ECM 系列产品

该系列为美国 BTX 公司产品。该公司是专业的细胞电融合、电穿孔仪的生产厂家。BTX 产品已经成为科研工作者在电融合、转基因等应用领域的首选仪器。除电融合、转基因系统外，BTX 的产品还包括多达 25 种相关的配件。产品适用于动植物、细菌、酵母、哺乳动物、人类细胞（包括活体细胞）的转基因等操作。

ECM2001 综合了电穿孔仪和电融合仪的特点，在细胞预融合时可产生一种独特的

高频交流波，交流波将细胞排列成双体或珠链，以便进行融合，提高了融合的效率。在融合阶段，交流波和直流波的转换之间设有微秒开关，能在极短时间内从交流电转成直流电。在方波长电波的作用下，使细胞高效融合。融合完成后，立即产生了低电压的交流波可使已初步融合的细胞更完美地聚集在一起，完成细胞圆体程序。当转基因向导流需要较高的电压和较长的脉冲时，直流方波长脉冲可单独使用，完成转基因过程。

（二）Multiporator 多功能细胞电融合仪

该型号仪器为德国 Eppendorf 公司产品。细胞在交流电场中聚集，然后通过直流脉冲融合，结合特定融合缓冲液体系，可完成高效的细胞电融合。微融合杯配有精密控制装置，可用于优化细胞聚集和融合的参数，再直接用于螺旋融合杯上。螺旋融合杯为高精度的电击杯，带有两条平行环绕的铂丝，容量为 250μl。该型号仪器可用于哺乳动物细胞和植物细胞电融合。

第四节　细胞电融合仪和电穿孔仪在生物学中的应用

一、细胞电融合仪在生物学中的应用

（一）胚胎操作/核移植/动物克隆

核移植是将细胞核从供体转入受体的过程。在这个过程中，电融合用于将供体细胞与受体卵细胞融合，并进一步激活细胞分裂，形成胚胎。技术的进步使研究人员能够从分裂球进展至更高分化的胚胎细胞以及静止的胚胎细胞，作为核的供应来源。胚胎产生的细胞在体外培养 6～13 代，然后在转入前使用血清饥饿的方法使细胞静止。现已经成功实现使用非老化胚成纤维细胞作为核的供体进行核移植而产生绵羊克隆转基因牛；从成年羊的乳腺的细胞产生出第一个克隆动物——多莉。使用分化的成年细胞进行克隆的技术打开了核移植广泛运用的大门，即基因治疗。对于这些用途可以使用多种细胞融合样品池及微型载玻片。

（二）动物细胞融合

目前在过继性免疫疗法中使用肿瘤细胞及树突细胞的电融合。肿瘤细胞本身不能作为良好的抗原提呈细胞，因此不会刺激 T 细胞生长。树突细胞是已经发现的最好的抗原提呈细胞，在融合后可以将肿瘤细胞转变成抗原提呈细胞。刺激后比未融合肿瘤细胞至少增加 100 倍。对于这些用途可以使用多种细胞融合附件及微型载玻片。

（三）杂交瘤/细胞杂交瘤技术

在过去的 10 年中，使用电融合技术进行杂交瘤及抗体的产生大大增加。电融合的过程可以通过显微镜进行观察，与聚乙二醇（PEG）相比需要的细胞数量较少，而且还具有无毒性及高效性的优点。对于这些用途可以使用多种细胞融合附件及微型载玻片。

（四）植物原生质的融合

电融合可被用于融合植物原生质以产生杂交体及创造具有所需特性的作物。已有数据显示电融合与传统的 PEG 融合方法相比，可以改善融合效率以及可重复性。对于这些用途可以使用多种细胞融合附件及微型载玻片。

二、细胞电穿孔仪在生物学中的应用

（一）电穿孔诱导基因转移

利用电穿孔技术转化动物细胞杂种已经成为许多实验室一种有效的常规手段，它比传统方法的效率要高数倍至上千倍，不仅广泛用于建立各种转化细胞株，而且为遗传病的基因治疗开创了良好的前景。电穿孔在植物生物工程中也有着广泛的应用，可以高效地把外源 DNA 或 RNA 注入受体细胞，建立起转化新植株，可以获得耐寒、耐旱、抗虫、抗病毒等优良品种。细菌电穿孔转移基因应用研究近年来有了很大发展，目前已有一百多种细胞成功地进行了基因电转移。

（二）电插入法将蛋白质分子插入细胞膜

当外加电场大于或等于临界值时，细胞膜上形成亲水的孔洞，贯通于细胞内外。此时，可将外源蛋白质插入细胞质膜，而不会造成明显的损伤。

（三）蛋白质分子导入细胞

在最佳条件下，电穿孔可使细胞损伤最小，而又使细胞有效地通透，将限制酶、抗体等导入细胞。例如，将肿瘤天冬酰胺合成酶的单克隆抗体导入鼠淋巴细胞和人成纤维细胞 HT-5 中，细胞成活率达 80%～90%，而且 90%的活细胞结合了抗体。

（四）建立基因库

电穿孔技术现已被公认为原核细胞中进行基因转移的最有效的手段。对一些好的菌株，其转化率高达 $10^{10}/\mu g$ DNA，从而仅用少量 DNA 即可构建综合的基因库。

（五）在原位研究酶活性

例如，海胆在受精过程中，酶的生理活性增强。而酶是影响新陈代谢的因素，研究表明在酶调节机制过程中，电穿孔对细胞完整性的干扰最小，可以把带标记的底物导入细胞，进行酶活性的体内研究。

第五节　细胞电穿孔仪和电融合仪的发展

细胞电穿孔、电融合技术经过 20 世纪 70 年代的奠基阶段以及 80 年代初的初创阶段之后，从 1984 年起已经步入广泛使用阶段，直接用于具有新的生物学性状的细胞株。电

穿孔仪和电融合仪的发展趋势有以下几个特点：首先是改进电极系统，使之具有高效率、大容量和自动化的特点。自1984年以来，德国、日本、美国、中国等国已申报各种电极系统的专利不下百余种。其次是生产配套使用的AC、AD电源设备，为在电极间的细胞悬液中建立起电压为1～10kV的电场强度，要求脉冲电源输出电压达数百伏，乃至数千伏，瞬时输出功率数百千瓦。再次是放电程序自动化并具有完善的检测显示功能。

目前新出现的细胞电穿孔、电融合仪器很多，新技术和新理论的运用使得该类仪器的应用更加广泛。下面主要介绍近年来出现的空间细胞电融合仪。

由于不同细胞的密度不同，在地面存在地心引力的情况下，不同细胞的沉降速度不同，造成细胞融合率较低。在空间微重力的环境中，融合液中细胞重力沉降现象消失，可以提高电融合杂种细胞的融合率和细胞活力，因此欧美各国都把空间细胞融合作为未来空间站的应用问题加以研究。空间细胞电融合仪突破了细胞电融合室设计、融合信号的发生与控制、图像观察与记录等关键技术，可以满足微重力环境下动物细胞和植物细胞的融合条件，并真实地记录空间细胞融合的有关信息。确定了较为合适的微重力条件下的细胞电融合参数后，就可以进行空间细胞电融合实验，为开展空间生物加工和空间制药领域的技术研究建立了良好的基础。这一技术可以应用于返回式卫星、载人飞船等空间飞行器中，以获取具有实用价值的杂种细胞。

我国发射成功的“神舟”四号飞船上，已经利用我国自行设计的空间细胞电融合仪进行动物细胞和植物细胞的电融合实验。动物细胞电融合实验采用小白鼠B淋巴细胞和骨髓瘤细胞。B淋巴细胞在体外不能进行繁殖但能产生抗体，骨髓瘤细胞在体外可以无限繁殖，利用“优势互补”的原理，将B淋巴细胞和骨髓瘤细胞进行融合，可以得到一种既能进行无限繁殖又能产生某一特定功能的单克隆抗体的杂种细胞，用以生产单克隆抗体，具有极大的应用前景和经济效益。植物细胞电融合实验采用的是有液泡的黄花烟草原生质体和脱液泡的革新一号烟草原生质体，这两种植物苗本身的细胞性状明显，且已进行了大量深入的研究。细胞融合对于植物研究既是一个分析手段，又成为一个有力的合成手段，融合后的细胞为细胞遗传物质的优化提供了各种可能性。

主要参考文献

程东升，李国兰．1995．电诱导细胞融合仪的研制及在真菌原生质体融合中的应用．微生物学通报，（1）：14～17

沈羡云．2003．神舟四号上的细胞融合实验．中国航天，（9）：10～12

汪和睦，谢延栋．2000．细胞电穿孔电融合电刺激原理技术及应用．天津：天津科学技术出版社．20～28

Schitt J J, Zimmermann U, Neil G A et al. 1989. Efficient generation of stable antibody forming hybridoma cells by electro-fusion. Hybrioma, 8 (1): 107～115

Vienken J, Zimmermann U. 1985. An improved electro-fusion technique for production of mouse hybridoma cells. FEBS-Lett, 182 (2): 278～280

Zimmermann U. 1982. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. Biochem Biophys Acta, 694: 227～277

第十一章　核酸杂交箱

核酸的发现及其作用和结构的阐明，标志着生物学研究已进入分子水平。DNA 双螺旋结构模型的确立与核酸的碱基配对规律和复制方式的提出，确立了核酸学说在分子生物学中的地位，也为核酸杂交的运用奠定了基础。近年来，核酸杂交技术的发展极其迅速，已涉及生物学的各个领域，广泛应用于基因克隆的筛选、酶切图谱的制作、基因组中特定基因序列的定量和定性检测、基因突变分析以及疾病的诊断等方面，已经成为生物学研究领域中最常用的基本技术之一。

第一节　基本原理与基本概念

一、核酸杂交类型及原理

由于核酸有 DNA 与 RNA 两类，因此核酸杂交就涉及三种不同的形式：DNA-DNA 杂交、DNA-RNA 杂交和 RNA-RNA 杂交。虽然杂交的类型不同，但核酸杂交结合的机制是一致的，基本原理都是具有一定同源性的两条核酸单链在一定条件下（适宜的温度范围和离子强度等）可按碱基互补配对原则退火形成双链，这一过程是高度特异性的。杂交的双方是待测核酸序列及用于检测的已知核酸片段（探针）。待测序列可以是克隆的基因片段，也可以是未克隆化的基因组 DNA 和细胞总 RNA。将核酸从细胞中分离纯化后可以在体外与探针杂交（印迹杂交），也可直接在细胞内进行（细胞原位杂交）。

在杂交体系中，探针与样品中未知的核酸进行杂交的目的是检测样品是否有已知核酸的同源片段。已知核酸片段都带有检测指示系统，而经过处理的待测样品固定在支持物上（大多数为硝酸纤维素膜）。与样品结合的标记核酸在洗膜时不被洗去，而未结合者则被洗脱，最后加入显色指示系统判定杂交的结果。为了便于示踪，常用的探针标记物是放射性核素，近年来也发展了一些非放射性的标记物。这些检测方法要求很高的灵敏度。DNA 的固-液杂交过程包括以下过程。

（一）变性

DNA 的变性伴随着一系列的理化性质的改变。DNA 具有增色效应，可以用紫外吸收的变化示踪 DNA 变性的过程。缓慢加热 DNA 溶液，达到一定温度前，其 260nm 吸光度基本保持不变；继续升温，其紫外吸光度在狭窄的温度范围内急剧上升，最高约增加 40%；继续升温，其紫外吸收率基本保持不变。这一变化反应了溶液中 DNA 双链已完全解离为单链。

（二）复性

变性的 DNA 两条互补单链，在适当条件下重新缔合形成双链的过程称为复性或退

火。复性温度受很多因素影响：DNA 浓度、DNA 分子质量、温度、离子强度和 DNA 分子的复杂性等。温度过高，有利于 DNA 变性而不利于复性；而温度过低，则少数碱基配对形成的局部双链不易解离，难以继续寻找正确配对。适宜的复性温度是比 T_m 低 2～5℃。

（三）杂交体系建立

建立杂交体系应考虑到以下因素：离子强度、DNA 浓度、DNA 探针的长度和温度。选择适当的杂交和洗膜温度是核酸分子杂交成败的关键因素之一，杂交时间的选择也是非常重要的。实验过程分预杂交、杂交和洗膜三个过程。洗膜过程中，震荡和温度控制是至关重要的，此过程应保持膜不干燥，灵活掌握时间。

二、杂交方法

按照杂交反应所用的支持物不同，分为固相杂交和液相杂交。大部分固相杂交都是用滤膜作支持物的。

（一）斑点杂交

单链的 DNA 或 RNA 在适当的条件下被固定在硝酸纤维素膜上，且不失去形成双链的活性，与标记的单链病毒探针共同孵育，同源片段间发生杂交。该方法的特点是不用限制性内切核酸酶消化核酸和凝胶电泳分离，操作简单，不必从样品中抽提核酸，一次能检测多份样品，在诊断中显示了极大的优越性。

（二）印迹杂交

膜上印迹杂交是指将待测核酸经限制酶水解，凝胶电泳，并将 DNA 片段转移到固定相支持物上，然后与存在于液相中标记的核酸探针进行杂交的过程，它是目前最常用的一种核酸分子杂交方法。该方法是一种敏感特异的方法，可从细胞 DNA 中检出特异的病毒核酸，并可确定片段的大小及在细胞中存在的状态。

（三）原位杂交

该方法是检测组织细胞内 DNA（RNA）的定位性方法。把病毒感染的细胞组织切片固定在载玻片上，使核酸原位变性后和标记探针进行杂交，然后加入显色反应系统，在显微镜下检查判定。

（四）“三明治”杂交

该方法是用标记核酸包被固相载体，先将非标记探针固定于载体，这种固定的“捕获探针”可同互补的待测核酸结合，再用标记的第二探针（该探针与固相探针反应）对此核酸进行检测。

三、影响杂交的因素

核酸杂交是较为复杂的过程，受到许多因素的影响和制约。

（一）pH 和离子强度

pH 影响离子、电荷的分布。pH 过高或过低都不利于杂交反应，一般选 pH7.0 左右。提高杂交液的盐浓度可促进核酸分子间的杂交；同时杂交温度也相应提高，使用 RNA 探针进行杂交，盐的浓度过高会使膜的本底加深。

（二）温度和时间

文献报道无甲酰胺体系的杂交温度为 68℃，甲酰胺（50%）体系为 42℃。甲酰胺增加使杂交温度降低，当使用高浓度探针或较短及重复序列的探针时，可缩短杂交反应的时间。

（三）葡聚糖硫酸脂

葡聚糖硫酸脂能加速核酸杂交反应，对 250 个碱基以上的探针效果较显著。

第二节 组成结构和性能特点

（一）组成结构

核酸杂交箱如图 11-1 所示。

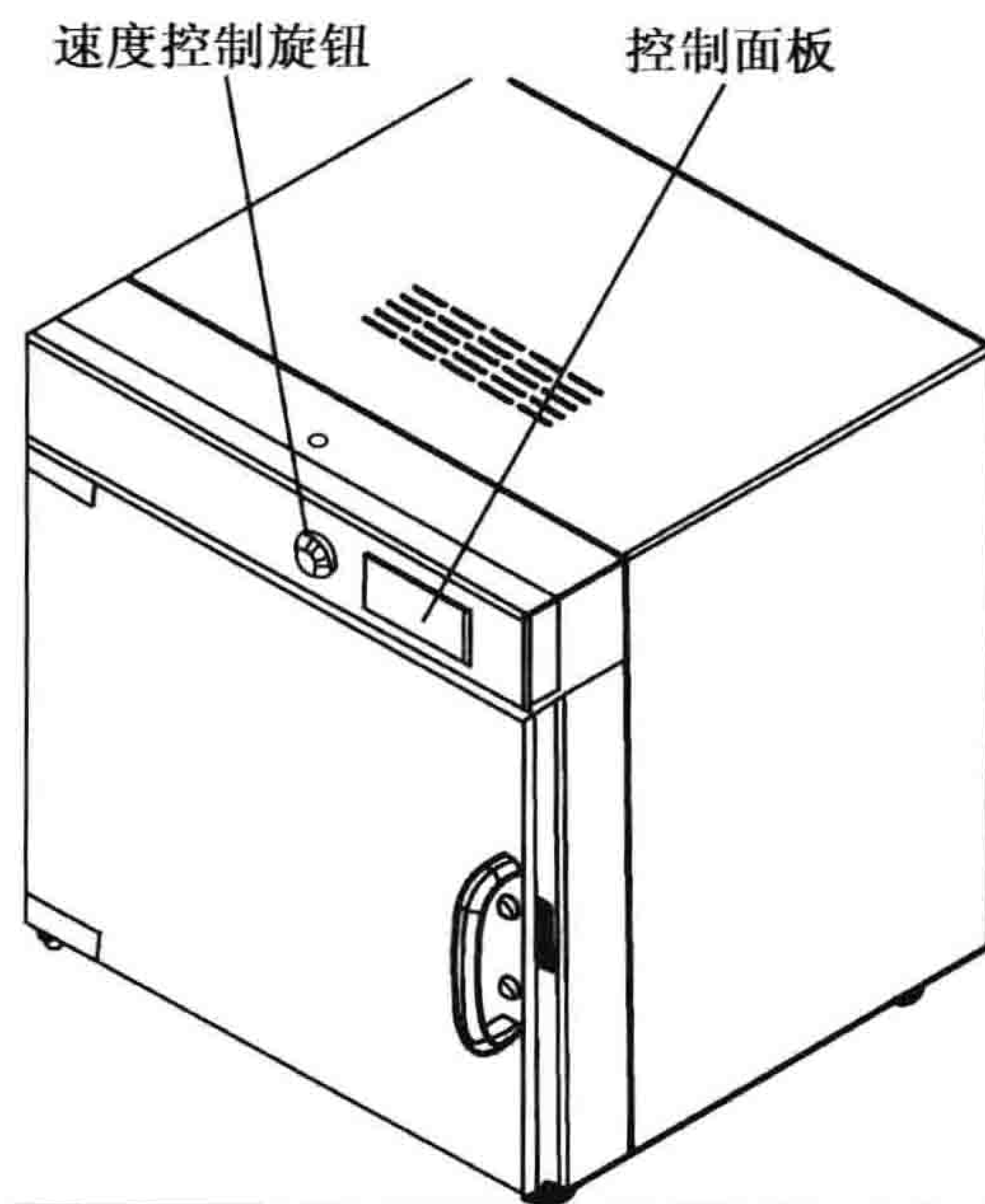


图 11-1 核酸杂交箱外观示意图

（二）不同型号仪器的性能特点

1021 型杂交箱。该型号核酸杂交箱为 B/T 公司产品，它从根本上取代了塑料袋和水浴摇床；微处理机提供准确的温度控制，安全方便；有可靠的过温保护；温度精确度 0.1℃，温度均一性 0.25℃；放置空间小，可装 12 个瓶；以瓶旋转取代了振荡；旋转频率 0.15r/min 通过 LCD 输入；旋钮可以帮助安卸杂交管，杂交管为聚四氟乙烯，透光好，不易擦刮；加热迅速，从室温到 65℃仅需 7 min。

第三节 使用方法

一、使用操作

1. 安装过程

1）将仪器放置在平稳的工作台上，保证空气输入、输出畅通。

2）逆时针方向微调仪器底部旋钮，使仪器水平放置。

3）按照仪器说明书所示，将所有导线、连接线与仪器背面上的相应插口连接。

4）将底板和背面板安装到杂交箱上，这一步须由专业的仪器工程师完成。

2. 操作过程

1）选择试管，根据试管大小选择合适的反应滤膜和反应物。

对于小型试管，需要进行组合方能放入杂交箱中进行旋转，如 3 个直径为 44mm 的试管、16 个 15ml 的试管进行组合（图 11-2）。

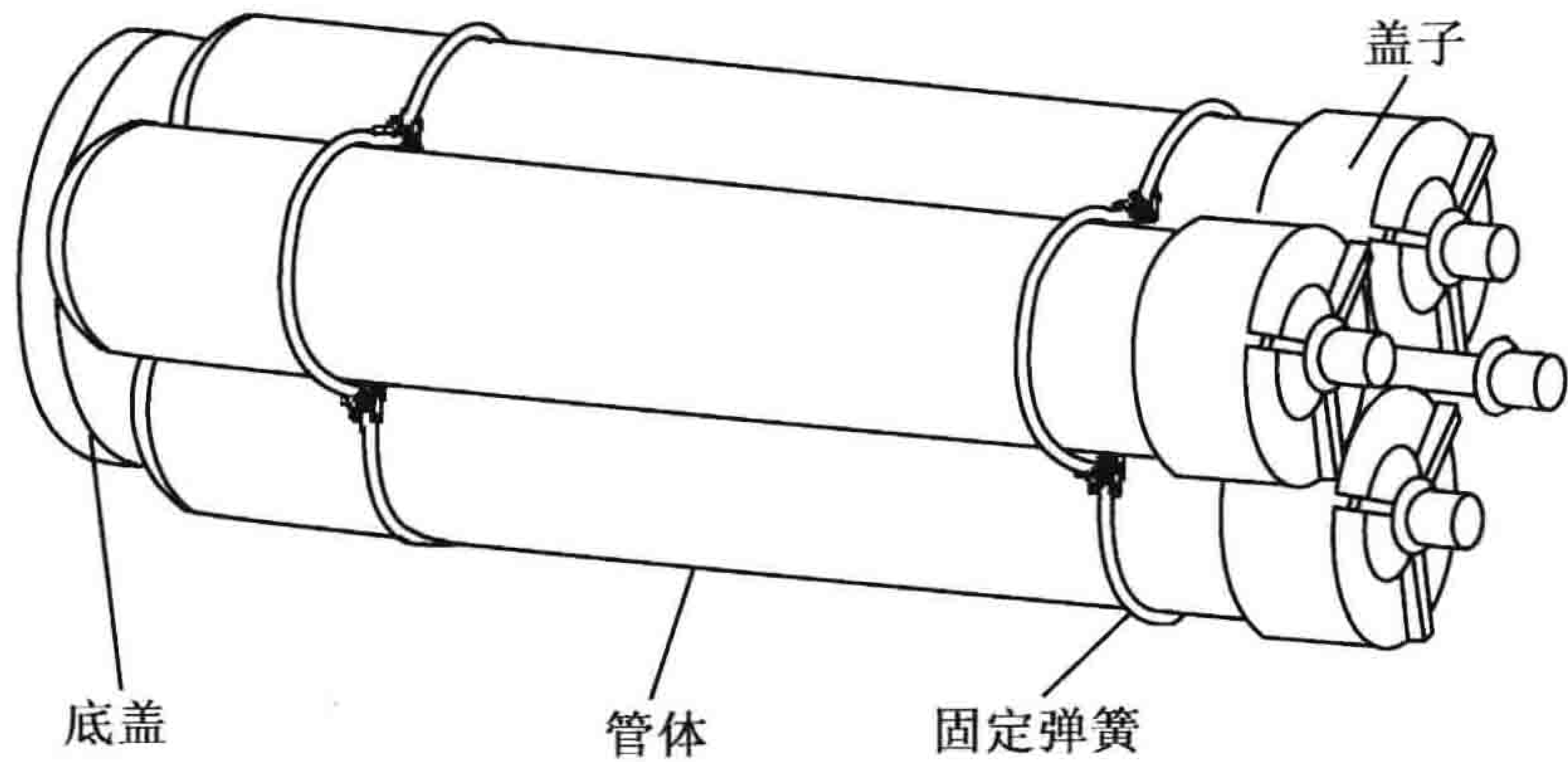


图 11-2　3 个 44mm（直径）试管组合

2）以 Southern 杂交为例，将湿润的滤膜放入杂交试管内，使其能够贴附在管壁上，有 DNA 的一面朝内。操作过程中要避免产生大的气泡，只要滤膜的表面浸没在杂交缓冲液中，较小的气泡不会影响杂交。一个试管中可以放置多块滤膜，但是这样会导致检测信号的轻微丢失。

3）将试管放入杂交箱中，确保其能自由旋转，关上箱门。

4）将杂交箱与电源连接好之后，打开电源开关。

5）进行温度控制。如图 11-3 所示，按下“P”键，显示设置温度，分别按升温按钮和降温按钮进行温度设置。若 5s 内没有输入，则显示测量温度。若要确认设置温度，随时按下“P”键即可。



图 11-3　核酸杂交箱控制面板示意图

6）调整速度控制旋钮，即可达到所需速度。

7）预杂交。根据滤膜的数量以及试管的体积，加入 5ml 或 10ml 杂交缓冲液，将滤膜浸没。进行一定时间的预杂交。

8）杂交。倒置试管，排净预杂交缓冲液，通过顶端小孔用注射器注入含有放射性探针的杂交缓冲液。对于直径 80mm 的大试管而言，一块滤膜的最少缓冲液体积为 5ml。

9）洗膜。这一步根据杂交种类不同有不同的要求。如基因杂交，就可按如下方法进行洗涤：2×SSC，50ml，10min；2×SSC，50ml，10min；0.1×SSC，0.1%×SDS，50ml，10min。

3. 操作注意事项

由于核酸杂交箱的工作温度可高达 80℃，且使用放射性探针，为了保护操作人员免于伤害，需要做到以下几点。

1）仪器在高温状态下，操作人员需要适当的保护措施，如戴上手套后才能将杂交试管从杂交箱中取出。最好是将仪器切断电源，冷却至 40℃以下再取出试管。

2）80mm 和 44mm 两种型号杂交试管的彩色顶端有两个小孔，作用分别是让受热空气排出试管和注入杂交缓冲液及探针。注意不要使探针从这两个小孔溢出，更要避免倒置试管而导致液体流出。

3）放射性探针可以多次使用。放射性废弃物需要收集起来进行集中处理，严禁任何具有潜在危险的处理方法。

二、故障排除

1）当仪器温度过高时，会自动停止加热，但杂交试管仍在旋转。此时需要检查停止加热的原因，若没有明显原因，可进行重启，重启键在仪器背面板上。

2）控制面板显示“Err”，显示加热器停止工作或接触不良，仪器会自动降温。

3）电源连接无误，但控制面板无显示，可能是保险丝熔断所致，更换合适保险丝即可排除故障。

三、维护与保养

1）杂交试管要定期检查，若有损坏必须及时替换。如果试管底部损坏，则插入底盖时试管会破裂。若使用放射性探针，需要给试管加上放射性保护底盖。直径 80mm 的大试管的密封圈需要定期检查，防止泄漏。

2）清洗仪器之前需要切断电源且待仪器冷却。用软布蘸取洗涤剂擦拭即可，仪器的任何部件不可浸泡清洗。不要用丙酮或腐蚀性洗涤剂清洗，不要用乙醇或甲醇擦拭聚丙烯材料的箱门。

第四节　在生物学方面的应用

由于核酸分子杂交的高度特异性及检测方法的高度灵敏性，核酸分子杂交箱在分子生物学领域中被广泛应用于基因克隆的筛选和酶切图谱制作、基因组中特定基因序列的定量和定性检测、基因突变的分析以及疾病的诊断等方面。分子生物学发展到今天的水平，核酸分子杂交技术起着重要的作用。

（一）在基因工程中的应用

基因工程的首要问题是要分离取得目的基因。运用传统方法获得纯度较高的目的基因是很困难的，而用标记的核酸作为待分离目的基因的探针，可简化分离过程，提高基因的克隆效率。所使用的核酸探针能与待分离样品中的目的基因结合，达到与其他核酸分离的目的。

（二）病毒、细菌性疾病的诊断

兽医学中已有许多核酸探针寻找病原微生物的成功报道。与传统的方法相比，核酸探针的特点是快速、准确。以前对病毒的潜伏性感染和整合性感染的诊断是十分困难的，而探针既可对病原作追踪检测，又能检出与动物的核酸整合在一起的病毒基因，从而开辟了基因诊断的新领域。

（三）寄生虫检测

瑞典 Frenzen（1984）制成一种特异的检测恶性病原虫的分子探针，当患者血液中原虫的含量为 0.001%时，仅 50μl 的血液即可做出诊断，灵敏度远远超过血涂片镜检；此外这种分子探针还可进行锥虫病及利什曼病的诊断。

（四）遗传病及有害基因的检出

遗传病是当今医学的难题之一，尤其是隐性基因的检出是极其困难的。核酸探针杂交大大推进了遗传病的检测技术，各种遗传性贫血病已有探针检测的成功报道。限制酶水解核酸结合“三明治”杂交法，已能检出核酸链上几个核苷酸的突变位点。

（五）癌症的诊断

近年来发现肿瘤细胞具有可辨认的致癌基因，专家认为用探针诊断癌症要比其他方法更具潜力。据报道，美国 Amgen 公司和 Abbott 实验室已联合合成了检测致癌基因用的探针。

第五节　发展趋势

核酸杂交箱作为分子生物学研究的有力手段，需要不断改进才能适应当前生命科学快速发展的需要。与生命科学领域中其他仪器一样，该类仪器也向着微型化、智能化、多功能化的方向发展，同时采用大量的新技术、新方法来提升仪器的科技含量。核酸杂交箱的主要发展趋势有以下几个方向。

一、功能多样化

目前已经出现了固液相分子杂交仪，该仪器依据核酸分子杂交技术原理，采用微机控制，既能做固相杂交又可做液相杂交，还可作为酶联反应的孵育器；与酶联免疫反应

结合可建立全定量或半定量 PCR 检测方法，已在病毒、细菌疾病的基因诊断的临床检测中具有良好效果。

二、被动杂交向积极杂交转变

“导流杂交法”的原理是主动将目标分子导向并固定在薄膜纤维上，抓取探针后再跟捕捉的分子进行杂交产生复合物，其余不受限制的分子穿过薄膜后被清除。因此在节省时间和反应物方面，“导流杂交法”远胜于传统被动杂交法。根据这一原理设计的核酸杂交仪，提高了分子间的相互作用，由传统的二维平面的相互作用提升至三维空间的相互作用，并能将杂交、转移、印迹、清洗四步结合起来，因而快速、简便且试剂耗用量低。该类杂交仪还可以给杂交技术提供可控制的条件，而且可应用在不同的实验，包括 Southern 印迹、Western 印迹、斑点印迹和反斑点印迹技术，还可以进行遗传病、传染病、癌症的检测以及亲子鉴定、司法鉴定、食品检验等。

三、适于“芯片杂交”的仪器的出现

目前，由于生命科学的微量化发展趋势，已经出现了多通道独立温控生物芯片杂交仪，这是一种可用于生物芯片杂交、杂交后清洗和干燥的自动化系统，适用于核酸芯片杂交反应或蛋白质芯片的免疫反应过程的自动控制。

四、适应性针对性的提高

在防治世界性传染疾病的过程中，运用核酸杂交箱可进行快速诊断，如对非典型性肺炎（SARS）的诊断与治疗。在获得了 SARS 的相关对照物后，运用 DNA 快速杂交分析仪进行诊断具有快速、准确、经济等特性，可以同时进行多达 96 个样本的检测；不仅可以诊断 SARS，而且可以检测分析相关病毒基因；不仅可以进行有关疾病确认，更可以进行早期诊断。通过 DNA 快速杂交仪进行 SARS 诊断，在进行基因扩增后，15 min 内即可清楚地看到样本呈现“阴性”还是“阳性”，同时可以把已知的变种 DNA 检测出来，操作非常简便。

五、基因探针杂交仪的出现

传统的诊断方法主要有病原体镜检与血清学检测两种。基因诊断是指采用分子遗传学中的核酸分子杂交方法，寻找患者病原体基因。与传统方法相比，基因诊断能直接确认疾病因子的有无和类型，更加精确快捷。目前已经出现了基因探针杂交仪，浓缩了实验室基因检测的整个流程，其检测准确率也高达 95%以上。

此外还出现了微阵列晶片杂交系统，可以从微阵列晶片实验中得到更明亮清楚的晶片影像，从而获得更多的生物晶片资料。除了新型的杂交仪的不断涌现，在仪器中使用新技术也成为该类仪器发展的一大趋势，如快速注入技术的使用等。

主要参考文献

杨永钦. 1994. 核酸杂交及运用. 贵州畜牧兽医，(1)：25～27

第十二章　摇　　床

摇床，也称为振荡器，广泛应用于生物样品和细胞组织的培养，是微生物、病毒、遗传工程、植物、生物制品、医学等科研、教学和生产部门不可缺少的实验设备之一。目前在实验室广泛使用的恒温冷冻摇床是一种以空气或者液体为导温介质，具有加热、制冷功能且温度可调控的培养箱和摇床相结合的生化仪器。如图 12-1 是一种可控温度的自动化程度较高的摇床。

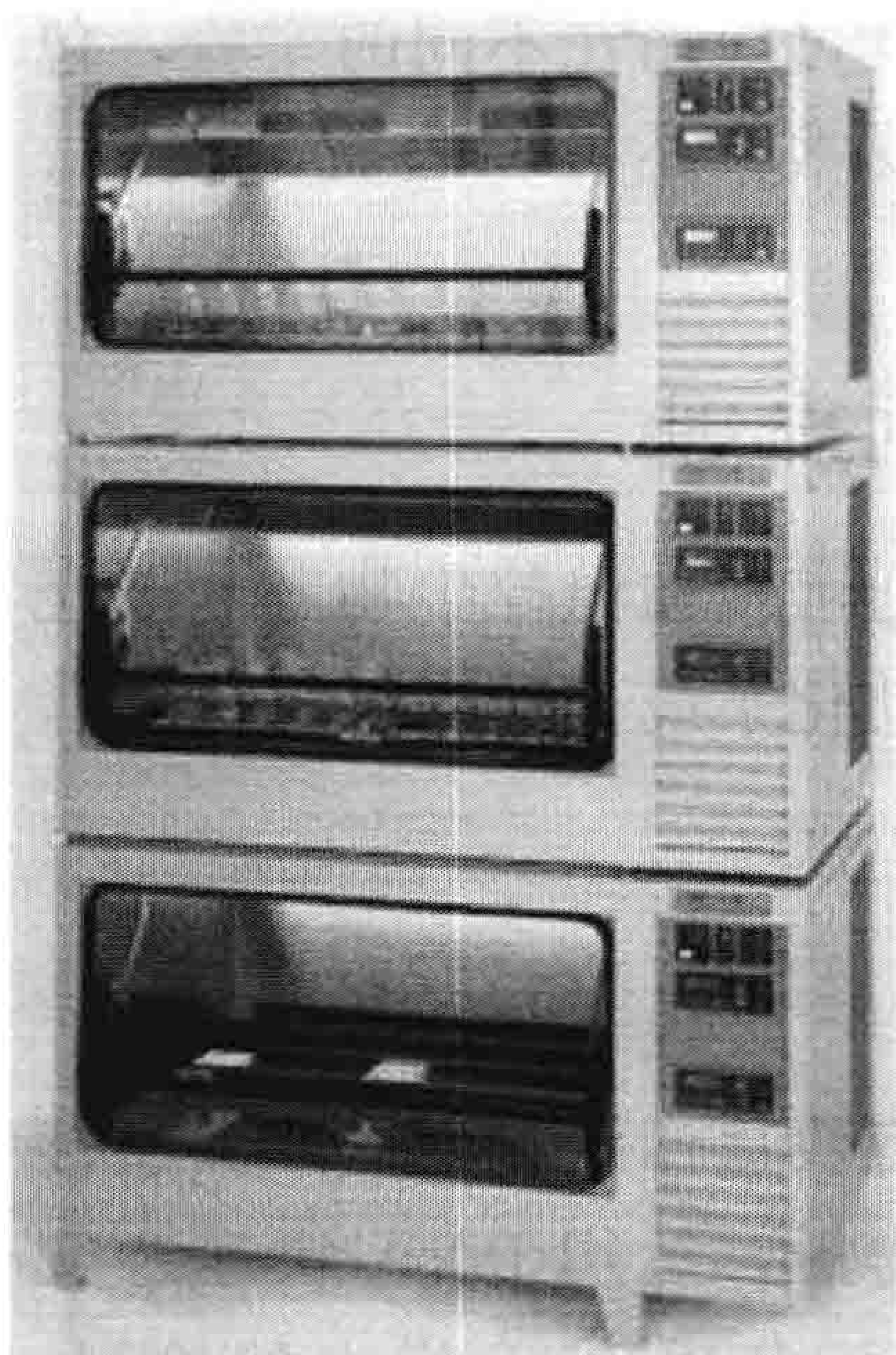


图 12-1　瑞士科耐公司（Adolf Kuhner AG）摇床 ISF-1-W（来自 www.bio-equip.com）

第一节　结构与特点

一、组成结构

摇床有多种不同设计种类，包括旋转式摇床（在水平面上旋转振摇，多用于锥形瓶内细菌培养）、水浴往复式摇床（在水平面上往返振摇，多用于在试管内增殖细菌）、跷板式摇床（如同跷板两侧上下移动，多用于电泳凝胶染色等）、倾斜旋转式摇床（形如倾斜的陀螺，中轴呈一定角度倾斜，板面做三维的复杂运动，主要用来混合液体）、旋流式摇床（由一强力小型电动机带动橡胶制圆形平台做半径很小的高速旋转运动，主要用来混匀小试管内的液体）。下面以旋转式摇床为例，介绍摇床的组成结构。摇床主要由摇台、驱动系统、电控系统、制冷系统、热源室、箱体等部件构成。

（一）摇台

摇台是装载试剂瓶的一种装置，有两种结构形式：一种为摇台板和瓶卡组成；另一种为摇台板上黏结尼龙搭扣板。这两种摇台板都是通过 4 个螺钉与驱动系统内轴承座上的托盘连接。一般摇床都具有多种规格（容量）的摇台，可以互相置换，满足用户的不同需求，也可按用户的要求加工成特殊的摇台。

（二）驱动系统

驱动系统由直流电机、三角橡胶带、大小皮带轮、轴承座、偏心轴及托盘等组成。偏心轴装在轴承座内与托盘连接形成一个整体。电机通过皮带轮、三角带驱动偏心轴转动，达到所需要的速度，转速由电控系统自动调节。

（三）电控系统

电控系统设有转速自动控制、温度自动控制和时间自动控制等装置。

1. 转速自动控制

转速自动控制采用集成电路对电机的转速进行自动调节，电机只需一次启动，其转速就能平稳地上升到预选值，并在这个速度上稳定地运行。

2. 温度自动控制

通过温度自动控制装置对加热元件和制冷单元的电源的“接通”和“断开”来实现摇床箱体内温度的自动控制。只要温度预选值确定后，箱体内温度就会被控制在预选值左右一个很小的范围内。

3. 时间自动控制

通过钟控电路装置对摇床的工作时间进行随意控制，一般都可采用不定时或24h内任意定时方式工作。

（四）制冷系统

制冷系统由制冷压缩机、冷凝器、过滤器、毛细管、蒸发器（安装在热源室内）等构成，其主要作用是为箱体内降温。

（五）热源室

热源室由加热元件和小型轴流风机等组成。其主要作用是使箱体内温度升高和均匀，通过控制使温度始终保持在一个范围内。

（六）箱体

箱体主要由箱体、门、控制仪表等组成。控制仪表安装在箱体上前方面板上。

二、不同型号仪器的性能特点

（一）ZHWY-211D/111D 大容量恒温培养振荡器

该型号恒温培养振荡器为上海智城分析仪器制造有限公司产品，广泛应用于对温度、振荡频率有着较高要求的细菌培养、发酵、杂交和生物化学反应以及酶、细胞、组织研究等，在医学、生物学、分子生物学、制药、食品、农业、环保等研究应用领域有着广泛而重要的应用。该仪器集恒温培养箱与摇床于一体，一机两用；采用自平衡偏心轮驱动机构，运转平稳；先进的大面积板式预热循环对流系统设计，确保良好的温度均一性；高精度的单片机 PID 温控电路，温控线性好、波动小；具有独特的电机过热、箱温异动、揭盖自停三重保护设计。

（二）ISF-1-W 瑞士科耐专业摇床（Adolf Kuhner AG）

瑞士科耐是有50年历史的摇床专业公司，其产品以独特的设计、精密的加工已成

为欧美很多著名跨国性生物医药公司的首选品牌。该型号摇床可进行连续操作，采用直接磁力驱动，可进行摇动、加热、冷却和湿度的控制。控制软件可对摇床的转速、温度、湿度、二氧化碳值进行编程、管理和校正。

第二节　操作使用

一、使用和操作要点

1）仪器应放置在平坦、坚固的地面上。工作环境应保持清洁整齐、通风干燥，避免阳光直接照射和尽可能远离其他热源。仪器四侧距墙 50cm 左右，便于通风及维修。

2）开机前仪表板上的控制开关均应处在非工作状态。调速旋钮应置于断开位置。

3）打开门，检查紧固螺钉是否牢固。装入试剂瓶，以摇台板几何中心为中心，对称平衡均匀分布，并注意装载试剂瓶不得超出摇台外，关好工作腔门。

4）接通外电源（这时仪表板上的控制开关指示灯均不应发亮）。

5）按下“电源”开关，摇床与电源接通（指示灯亮）。

6）转速控制。按下“启动”开关（指示灯亮），缓慢调节调速旋钮，至显示器上显示出所需要的转速为止。

7）温度控制。

a. 设定温度。按下“置温”按键，转动“调温”旋钮，至显示器上显示出所需要的温度数值为止。松开“置温”按键，此时显示器上显示出的温度数值即为工作腔内温度。

b. 如果环境温度低于设定温度，按下“加热”键（指示灯亮）；如果环境温度高于设定温度，按下“制冷”键（指示灯亮）。

8）时间控制。一般时间控制装置具有两种功能，包括时钟计时功能和长定时控制器功能。

9）停机。停机时必须将调速旋钮退至电位关断位置，各控制按键均应处于非工作状态，最后关闭电源开关。

10）仪器一般配有几种容量的摇台，可视实验需要选购及更换。更换时只要将摇台中部四个紧固螺钉卸下，换上需要的摇台并将螺钉紧固。

二、维护保养

1）应经常保持仪器的清洁，检查保险丝盒、控制元件及仪器各处紧固螺钉是否松动。

2）仪器连续工作期间，每 6 个月应加注一次适量的润滑脂，每年应保养一次电机，需用乙醇擦洗换向表面和加注电机轴承的润滑脂。

3）当电机的电刷磨损造成工作不正常时，应及时更换电刷。新电刷换上后，电机必须轻载低速（100r/min）运转 8h，以研磨电刷。磨后用清洁纱布沾乙醇擦洗换向器表面和刷握盒的内表面，完毕后装机使用。

4）摇床经长期使用，传动器轴承磨损而造成噪音过大或不能正常工作时，应由专业维修人员进行更换轴承。

5）卸除箱体下部的前后面板，检查传动皮带。如果皮带太松，可松开电机底板紧固螺栓，调节电机安装底板，使皮带适度张紧（不宜太紧），然后紧固松开的螺栓并试运转。如果皮带出现裂纹或大量毛边等现象，必须更换。

6）如果制冷系统出现了故障，必须由专业维修氟利昂制冷机的技术人员检查修理。

7）其他注意事项。

a. 电源必须有保护接地线。

b. 电器控制部分非专业人员请勿拆动。

c. 摇床高速旋转工作时，为避免仪器产生大的振动，所有培养试剂瓶应在摇台上对称放置，各瓶的培养液应大致相等。

第三节　在生物学方面的应用

摇床在生物学领域中的一个重要应用就是进行细菌培养，优化培养条件。如在分子克隆实验中经常会使用摇床进行大肠杆菌的培养、λ 噬菌体原种的培养以及 M 噬菌体的液体培养。目前已经利用摇床系统地分析了重组大肠杆菌生产人粒细胞集落刺激因子菌株的培养温度、诱导时机、pH、溶氧、种子菌龄、接种量等工艺条件，选择出了最佳培养条件，为大规模生产提供了可靠的放大依据。此外还利用摇床研究了重组大肠杆菌摇瓶发酵生产谷胱甘肽合成酶系的工艺条件，确定了该菌株的最适产酶条件。

除了进行细菌培养，摇床还可用于动植物细胞的培养。如目前已经利用摇床建立一种新的恒温摇动法纯化培养大鼠视网膜 Müller 细胞的技术，将原代培养后的混合性视网膜细胞固定在一个摇床平台上，进行振荡培养，通过免疫细胞化学的方法鉴定原代和摇动法得到的 Müller 细胞的纯度。结果表明摇动法所获得的细胞纯度可达 95% 以上，因此恒温摇床摇动法，可以作为一种快速可靠的纯化视网膜 Müller 细胞手段。此外，摇床也可以对草珊瑚等植物细胞进行悬浮培养，了解其培养特性，从而确定最佳培养条件和收获时机。

第四节　摇床的发展

传统的摇床一般都采用普通异步电机，通过齿轮减速器减速后驱动仪器工作，转速不易调节控制，耗能高，噪音大。随着科技的发展，传统的摇床已不能满足新产品的需要，目前已经出现了由单片机控制的能按任意设定曲线运行的定速往复式摇床。该类摇床采用 8039 单片机作为主机，通过步进电机驱动器控制步进电机，电机又直接驱动摇床，机械部分利用曲柄滑块结构将步进电机输出的旋转运动转变为床面的往复运动。8039 是美国 Inter 公司的 MCS—48 系列的低端产品，作为专用机使用具有可靠性高、信息不易丢失等优点。虽然步进电机具有一定的频率-力矩特性，但当系统启动时，如果速度过快，容易发生堵转。为防止堵转的发生，特意设计了步进循环增速子程序，供

系统启动时调用。摇床运行的时间-速度曲线是通过拨号盘输入的。该类摇床运用了微电子技术，符合产业发展方向，所用元器件价格低、性能高，如所用拨号盘仅几元钱，即可完成人机对话功能。该设备控制精度高，能耗小，省去了原设备的齿轮减速装置，降低了设备产生的噪音，改善了现场工作环境。

摇床作为生物学实验室中的常规培养设备，工作时间长，强度高，除了要注意日常的维护保养外，还要进行合理、有利的改进，以期发展出经济、耐用、多功能、智能化的新型摇床。

主要参考文献

苟琳，张作明，许汉鹏等．2002．恒温摇动法纯化培养大鼠视网膜 Müller 细胞的技术研究．眼科研究，(20) 5：411～413

李姆 H J．1975．工业微生物学．徐浩泽 译．北京：科学出版社．194～198

欧俊杰，王海波，王骊丽等．2004．重组人粒细胞集落刺激因子的摇瓶发酵研究．西北大学学报（自然科学版），(34) 2：183～187

彭彩欣．1999．变速摇瓶机的研制．包装机械，20 (6)：64～65

童群义，陈坚．2001．重组大肠杆菌生产谷胱甘肽合成酶系的摇瓶发酵条件．无锡轻工大学学报，(20) 3：228～232

张维铭．2003．现代分子生物学实验手册．北京：科学出版社．19～20

Highshide E．1984．Drug and the pharmaceutical science．Bioengineering，22：451～455

第十三章　生物反应器

生物反应器（bioreactor）是一种为生物体代谢提供一个优化的物理及化学环境，使生物体能更快更好地生长，得到更多需要的生物量或代谢产物的装置。与化学反应器不同的是生物（酶除外）反应都以“自催化（autocatalysis）”方式进行，即在目的产物生成的过程中生物自身要生长繁殖。生物反应器设备简单、结构严密，具有良好的液体混合性能、较高的三传速率、能耗低、易于放大，并具有配套而又可靠的检测及控制仪表等。

第一节　不同类型生物反应器的性能特点

生物工业中使用的生物反应器有多种形式。传统生物工业中使用的生物反应器称为“发酵罐”。20 世纪 70 年代，Atkinson 提出了生化反应器（biochemical reactor）的概念，其含义除包括原有发酵罐外，还包括酶反应器、处理废水用反应器等。进入 80 年代后，生物反应器一词在专业期刊与书籍中大量出现，它是指有效利用生物反应机能的系统（或场所），不仅包括传统的发酵罐、酶反应器，还包括采用固定化技术后的固定化酶或细胞反应器、动植物细胞培养用反应器和光合生物反应器等。

一、酶反应器

以酶为催化剂进行生物反应的场所为酶反应器。根据酶催化剂类别的不同，酶反应器可分为游离酶反应器和固定化酶反应器。固定化酶反应器又可分为固定化单一酶、复合酶、细胞器和细胞（微生物、动物和植物）等形式的反应器。主要分类如表 13-1 所示。

表 13-1　酶反应器的形式

名称		操作方式	说明
单相系统酶反应器	搅拌罐	分批、流加	靠机械搅拌混合
	超滤膜反应器	分批、流加及连续	适用于高分子底物
多项系统酶反应器	搅拌罐	分批、流加及连续	靠机械搅拌混合
	固定床或填充床	连续	适合固定化酶或微生物的反应中
	流化床	分批、连续	靠溶液的流动而混合
	膜式反应器	连续	膜状或片状的固定化酶
	悬浊气泡塔	分批、连续	适于气体为底物

从几何形状或结构来划分，酶反应器大致可分为罐型、管型和膜型三类。每一类又有多种类型，并且有些反应器可互相结合成具有不同性能的酶反应器系统。罐型反应器

内一般装配有搅拌装置，也称搅拌罐或发酵罐，适用于各种操作。管型反应器和膜型反应器一般用于连续操作。相对直径较大、纵向较短的管型反应器也称为塔式反应器。

二、通风发酵设备

通风发酵设备是生物工业中最重要的一类生物反应器，有通风式、气升式、鼓泡式、自吸式、通风固相发酵设备等多种类型，可用于传统发酵工业与现代生物工业。

（一）机械搅拌式发酵罐

机械搅拌式发酵罐，是指既具有机械搅拌又有压缩空气分布装置的发酵罐，主要部件包括罐身、搅拌器、轴封、打泡器、联轴器、中间轴承、空气分布器（或空气喷射器）、挡板、冷却装置、人孔及视镜等。

罐径在1m以下的反应器，封头可用法兰与筒身连接；罐径大于1m的反应器，封头直接焊在筒身上，但封头上应开上人孔，以便进罐检修。机械搅拌通风发酵罐的混合主要是通过机械搅拌来实现，机械搅拌不仅可促使培养基混合均匀，而且有利于增加气液接触面积，提高溶氧速率。搅拌器可以使被搅拌的液体产生轴向流动和径向流动，不同类型的搅拌器产生的两种流向有所侧重。生物反应器中常使用的搅拌器形式有：螺旋桨、平桨、涡轮桨、自吸式搅拌桨和栅状搅拌桨等，另外，翼型桨也已开始广泛应用于发酵生产，并取得较好效果。轴封的作用是防止泄漏和染菌。搅拌轴较长时，常分为2～3段，用联轴器连接。联轴器有鼓形及夹壳形两种。搅拌轴一般从罐顶伸入罐内，也可采用下伸轴。采用下伸轴时，常采用双端面轴封，并用灭菌空气来进行防漏和冷却。消泡器有锯齿式、梳式、孔板式和旋桨式等多种型式。空气分布器装置有单管及环形管等。生产中多采用单孔管，开口向下，也可采用带小孔的环状空气分布器。发酵罐的传热装置有夹套和蛇管两种，一般容积为$5m^3$以下的发酵罐采用外夹套作为传热装置；大于$5m^3$的发酵罐由于外夹套传热面受到限制而采用立式蛇管作为传热装置。挡板的作用是防止液面中央产生漩涡。通常搅拌发酵罐液体时，应达到“全挡板条件”，即在一定转速下增加挡板或其他附件，轴功率仍保持不变。

（二）气升式和鼓泡式反应器

气升式和鼓泡式反应器与机械搅拌通风反应器的不同在于无机械搅拌。这类反应器的特点是结构简单、氧传递效率高、耗能低、安装维修方便等。空气在喷嘴口以250～300m/s的高速喷入环流管，由于喷射作用，气泡被分散于液体中，上升管内的反应液密度较小，加上压缩空气的动能使液体上升，罐内液体下降进入上升管，形成气-液混合流连续循环流动。罐内培养液中的溶解氧由于菌体的代谢而逐渐减少，当其通过环流管时，由于气-液接触而被重新达到饱和。

罐内反应液在环流管内循环一次所需的时间称为循环周期时间。反应液的环流量与通风量之比称为气液比。反应液在环流管内的流速称为环流速度，环流速度一般取值为1.2～1.4m/s。喷嘴前后压差和反应器罐压与环流量有一定关系。当喷嘴直径一定，反应器内液柱高度也不变时，压差越大，通风也越大，相应就增加了液体的循环量。应注

意的是：罐内液面不能低于环流管出口，也不可以高于1.5m，因为过高的液面可能产生“环流短路”现象。气升式反应器已在有机酸（如柠檬酸、衣康酸等）、酵母及氨基酸等工业中应用。

最简单的鼓泡式发酵罐内部为一空塔，塔的底部用筛板或气体分布器来分布气体，其工作原理是利用通入培养基中的气泡在上升时带动液体而产生混合，并将气泡中的氧传入培养基中供菌体利用。

高径比比较大的鼓泡式反应器常称为塔式反应器。一般塔式反应器内装有若干块筛板，所以又称为高位筛板式反应器。压缩空气由罐底导入，经过筛板逐渐上升，气泡在上升过程中带动发酵液同时上升，上升后的发酵液又通过筛板上带有液封作用的降液管下降而形成循环。

（三）自吸式反应器

自吸式反应器是一种不需要空气压缩机，在搅拌过程中自行吸入空气的反应器。该反应器最关键部件是带有中央吸气口的搅拌器，搅拌器叶轮旋转时，叶片不断排开周围的液体使其背侧形成真空，由导气管吸入罐外空气，吸入的空气与发酵液充分混合后在叶轮末端排出，并立即通过导轮向罐壁分散，经挡板折流通向液面，均匀分布。

由于空气靠反应液高速流动形成的真空自行吸入，气液接触良好，气泡分散较细，因而溶氧系数较高。自吸式反应器的缺点是进罐空气处于负压，因而增加了染菌机会。

（四）通风固态发酵设备

根据固态发酵中通风方式与物料所处状态的不同，通风固态发酵设备可分为静置培养用发酵设备、通风培养用固态发酵设备和流化床式固态发酵设备。根据操作方式的不同，通风固态发酵设备又可分为分批式和连续式两类。

厚层通风制曲装置是目前国内使用较多的分批式通风固态发酵设备。制盘曲的曲盘，制帘子曲的帘子等是最古老且简单实用的固态发酵设备。另外一些现代化的固态发酵设备，如自动化制曲装置和流化床式固态发酵设备也早已应用。

连续式发酵设备有塔式、转鼓式和回转式等多种型式。塔式通风固态发酵设备外形为塔式，内有2～6层塔板，培养物料从上而下分级传输，在每一层塔板上发酵一定时间后传输至下一层，传送方法有多种。转鼓式通风固态发酵设备外形为放倒的圆柱体。圆柱体慢慢地连续转动，使内部物料随之翻动，起到通风搅拌的作用。若将圆柱形壳体略斜放置，可使物料连续慢慢地向较低一端移动，通过在较高一端不断补料，形成固态连续发酵。回转式固态发酵设备为一圆环形装置，外径为37m，装料量为400m^3，圆环形发酵装置旋转一周为46h，发酵时间为42h，其余为辅助时间。

三、嫌气发酵设备

生物工业中的嫌气连续发酵设备主要指啤酒连续发酵设备和乙醇连续发酵设备。啤酒连续发酵设备主要有塔式和多罐式两类。塔式发酵罐是英国APV公司20世纪60年代设计的用于啤酒生产的发酵罐。多罐式啤酒连续发酵设备是由2～3个容积较小的发

酵罐后接一个容积较大的酵母分离罐组成。

乙醇连续发酵是连续操作技术在发酵工业中成功应用的实例之一。乙醇连续发酵采用的设备有：单罐连续搅拌发酵罐、酵母回用连续搅拌发酵罐、透析发酵罐、固定化酵母发酵罐、萃取发酵系统、膜回收乙醇发酵系统、连续真空发酵系统、中空纤维发酵系统、多只发酵罐连接的连续发酵系统等。

四、植物和动物细胞培养反应器

动植物细胞培养是指动物或植物细胞在离体条件下进行繁殖，此时细胞虽然生长与增多，但不再形成组织。随着生物工程技术的发展，动植物细胞的培养已可在工业规模生化反应器中进行。动植物细胞与微生物细胞有明显的区别，首先动物细胞无细胞壁，而且动植物细胞对环境影响也十分敏感。培养中动植物细胞对培养基的营养要求相当苛刻，并且生长缓慢，所以动植物细胞培养体系需要严格防止杂菌污染。

（一）植物细胞培养反应器

用于植物细胞培养的核心设备称为植物细胞培养反应器。此类反应器与微生物发酵用反应器有许多相同之处，也采用通用式发酵罐、鼓泡式发酵罐、气升式反应器、流化床式反应器、固定床式反应器、膜反应器及振动混合反应器等。植物细胞培养反应器已从实验室规模的 1～30L 放大到工业性试验规模的 130～20 000L（图 13-1）。

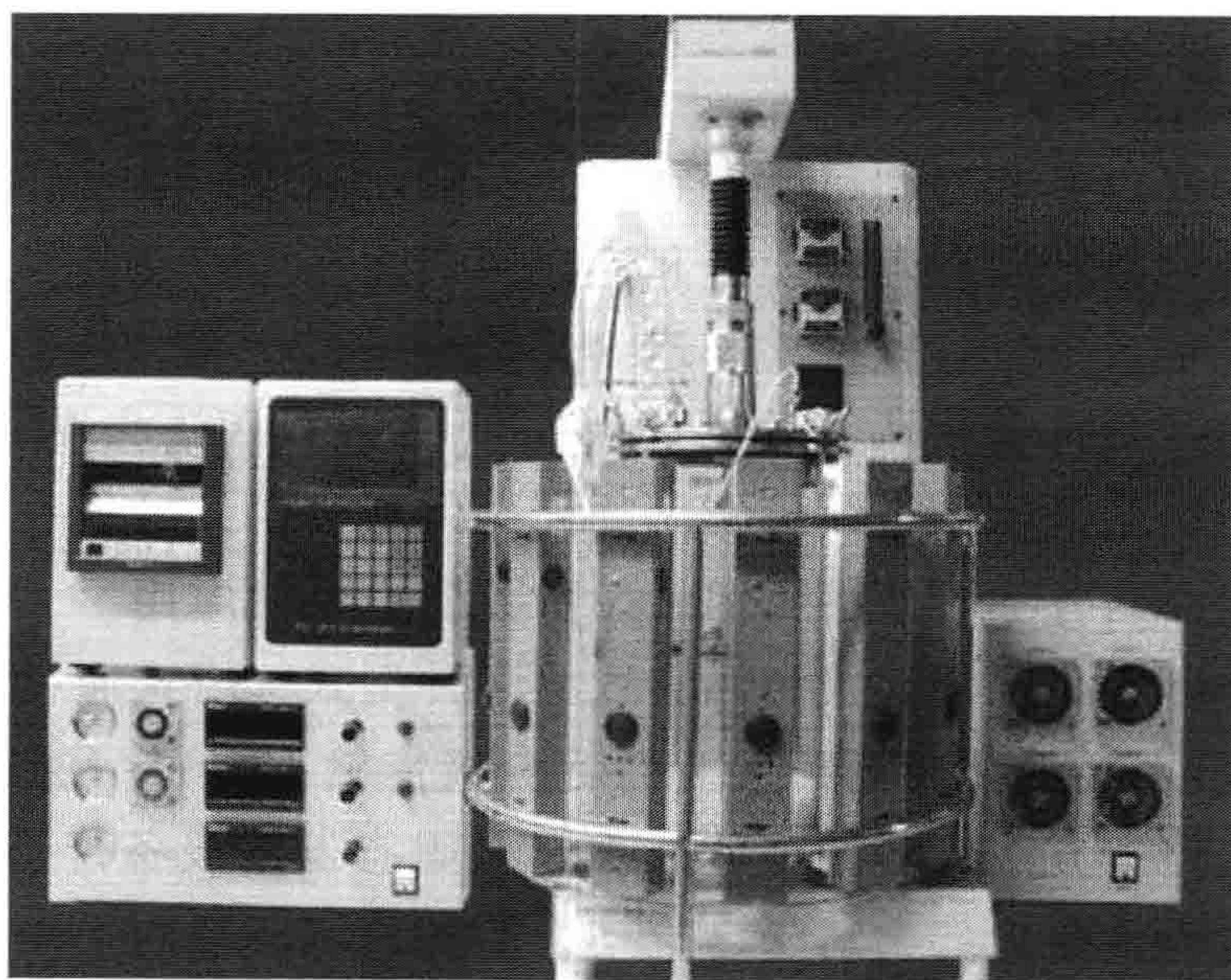


图 13-1　日本丸菱株式会社（MARUBISHI）植物光照反应器

（来自 http://www.js-jinxing.com）

（二）动物细胞培养反应器

动物细胞培养反应器有多种型式，这些反应器都是针对动物细胞无细胞壁，不能耐受强烈搅拌与通风的剪切力而设计制造的。

实验室规模的动物细胞悬浮培养反应器依靠磁力驱动的搅拌器低转速搅拌，这是因

为动物细胞无细胞壁保护，采用一般发酵罐的搅拌桨叶搅拌液体时，液体间的内切力往往过大而破坏细胞。搅拌桨有用尼龙丝编织袋制成船帆形，或者通过插入溶液中的硅胶管使氧气扩散到培养液内。目前工业规模的动物细胞悬浮培养反应器较大的有 $10m^3$，用来生产杂交瘤单克隆抗体。

多数动物细胞需附着在固体或半固体表面才能生长，细胞在载体表面上生长并扩展成一单层，所以贴壁又称为单层培养。传统的动物细胞培养反应器是转瓶，利用转瓶的缓慢转动，使动物细胞在瓶内壁贴壁生长繁殖。20 世纪 70 年代开发出的中空纤维培养装置进行动物细胞培养，细胞密度可达到 10^9 个/ml 数量级。中空纤维培养装置的主要组成是中空纤维管，只能让氧和二氧化碳等小分子自由地透过纤维膜双向扩散，而中、大分子有机物不能透过。动物细胞贴附在中空纤维管外壁生长，可很方便地获取营养物质和溶解氧。目前已有全自动转瓶培养系统用来培养动物细胞（图 13-2）。

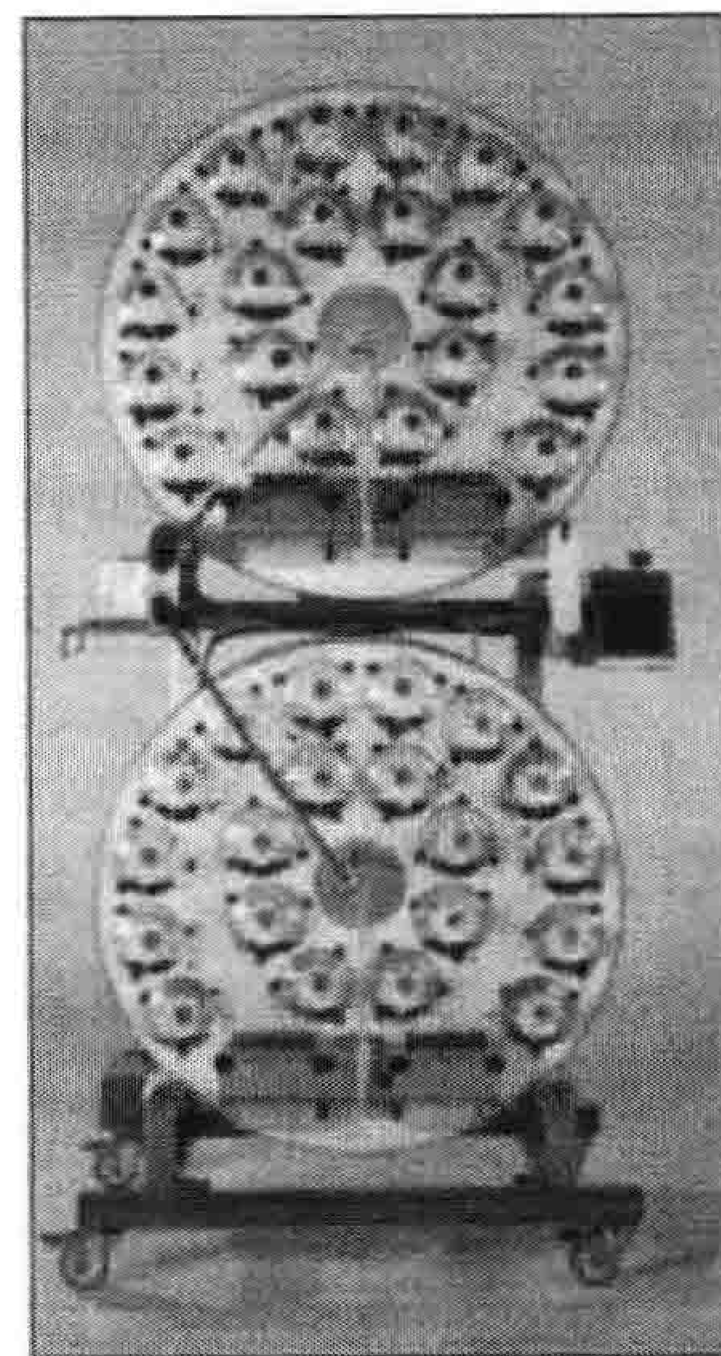


图 13-2　Equl（西欧产）全自动转瓶培养系统
（来自 http://www.bio-equip.com）

动物细胞微载体培养是细胞附着和生长在悬浮于培养液中的微珠表面，借助于温和搅拌，使细胞均匀分布的一种培养方法。这种培养方法是将单层培养和悬浮培养结合起来，具有容易放大、细胞所处环境均一等优点。贴壁培养动物细胞的载体微珠称为微载体。微载体的性能优良与否，是培养系统能否取得成功的关键。搅拌系统是微载体培养反应器中的重要组成部分。采用的搅拌器有螺旋桨、摆动混合式、带有流动导向口的转筒式等。空气可以从中空导向桨叶流入反应器，或者利用聚四氟乙烯中空纤维管作为通风供氧装置。

（三）微藻培养光合生物反应器

海洋生物包括海洋动物、海洋植物和海洋微生物。由于微藻在很多领域中的重要应用价值，人们已经越来越重视对微藻的开发与利用。由于微藻主要是光能自养型，它是通过光合作用生长，因此除了需要常规微生物发酵相近的条件外，还需光照和氧解析，并大量供应二氧化碳。

典型且常用的微藻培养光合反应器是敞开式跑道池，自 20 世纪 60 年代设计出来，至今基本未变，唯一变化之处是对其混合系统进行过改进。这类反应器的优点是成本低、建造容易。其缺点也非常突出，如培养效率低、培养条件无法控制、易污染、雨水会使培养基稀释、反应器中水分蒸发量大和能够进行生产的时间短等。

封闭式光合反应器的研制开发已有几十年历史。虽然封闭式光合反应器与敞开式反应器相比，具有培养效率高、培养条件易于控制、无污染、生长周期长和适合于所有微藻的培养等优点，但其取得实际研究进展是近几年的事。封闭式光合反应器按其接收光的方式可分为两大类：一类是外部光源，另一类是内部光源。外部光源封闭式光合反应器大部分处于中试规模，体积达 $10m^3$，面积达几百平方米，多数为管道式和板式，也

有罐式的。内部光源封闭式光合反应器在国外有产品出售。这种反应器已全部实现计算机自动控制。反应器型式有多种，如罐式、管式等，近年来还开发出透析式。

第二节　生物反应器的发展

随着人们对生化反应过程的研究越来越深入，需要建立许多数学模型来揭示诸多反应过程理论用于更好地设计生化反应工程。如利用建立好的模型，在计算机的帮助下可以实现过程的控制与优化。使用高级的过程监测对体外细胞内酶活性状态、代谢物浓度监测，以及体内质谱监测，配合一些代谢途径的了解，可以设计和实现生物反应中的代谢工程。

使用新型测量和控制技术可为建立模型提供重复性较高的数据，因此生物反应器在线监测系统、过程控制和新型测量技术方面发展迅速。

在线监测系统是过程控制的前提，先进的在线监测系统要求能够设定样品条件参数、自动取样及方便地对样品进行分析等功能。常用的在线监测仪器，如气相色谱和高效液相色谱由于其分析时间较长，会逐步被可用于快速分析的流动注射分析系统和质谱等检测设备所代替，而利用傅里叶变换近红外光谱和二维荧光光谱进行原位过程监测将是未来发展的趋势。

过程控制系统用于控制流速、气压、温度、转子的转速、pH、溶氧和操作的步骤（如灭菌、分批式操作和流线式操作）等。因此，高级电脑硬件，特别是微型计算机，将会快速地应用于生物反应器的过程控制中。

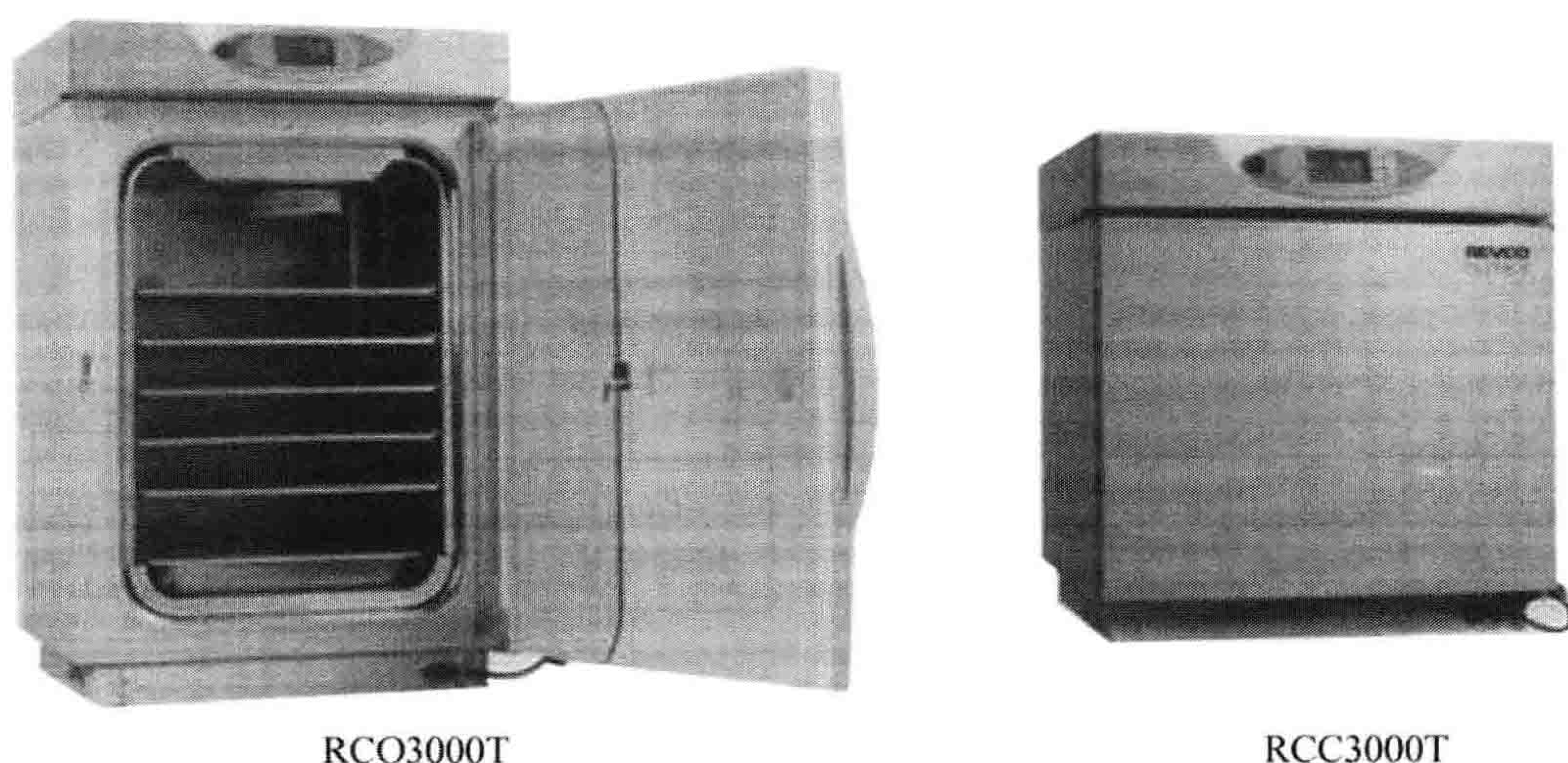
由于搅拌过程中对溶氧效率和氧气传递速度越来越高，新型搅拌器的研发将成为未来生物反应器研究的关键领域。

主要参考文献

贾士儒. 2003. 生物反应工程原理（第二版）. 北京：科学出版社. 135～168

第十四章　二氧化碳培养箱

二氧化碳培养箱是进行组织、细胞、细菌培养的一种实验室常用仪器，能够恒定地提供一定量（通常为 5%）的二氧化碳，用来维持培养液的酸碱度、pH。常用的二氧化碳培养箱分为气套式和水套式两种类型。如图 14-1 所示，为两种不同型号的水套式二氧化碳培养箱。为了保证实验数据和实验结果的准确可靠，在日常使用中必须经常测量和校准二氧化碳培养箱内的浓度，以确保实际浓度与设定浓度的一致性。



RCO3000T　　　　RCC3000T

图 14-1　美国 REVCO 二氧化碳培养箱（水套式）3000T

（来自 www.bio-equip.com）

第一节　基本原理与影响因素

一、基本原理（以水套式二氧化碳培养箱为例）

二氧化碳培养箱箱内温度一般设定在 37℃±0.2℃，通过电热丝给水套内的水加热，箱内温度传感器来检测温度变化，使箱内的温度恒定在设定温度。在加热过程中，加热信号灯始终点亮，当培养箱的温度达到设定温度并稳定后，加热器停止加热，信号灯熄灭。二氧化碳培养箱的二氧化碳浓度是通过二氧化碳浓度传感器来进行检测的。二氧化碳培养箱的工作原理示意图如图 14-2 所示；气体通路如图 14-3 所示。

二氧化碳传感器是能够检测箱体内二氧化碳浓度，并将检测结果传输给控制电路及电磁阀等控制器件。如果检测到箱内二氧化碳浓度偏低，则电磁阀打开，二氧化碳进入箱体内，直到浓度达到设定值。此时，电磁阀关闭，箱内二氧化碳浓度达到稳定状态。气体混合泵将箱体底部二氧化碳气体与空气充分混合均匀后，再次注入箱内，避免了二氧化碳的分层或不均匀现象。二氧化碳采样管将箱内二氧化碳和空气混合后的气体取样

到机器外部面板的采样口，随时可以用二氧化碳浓度测定仪来检测二氧化碳浓度是否达到要求。

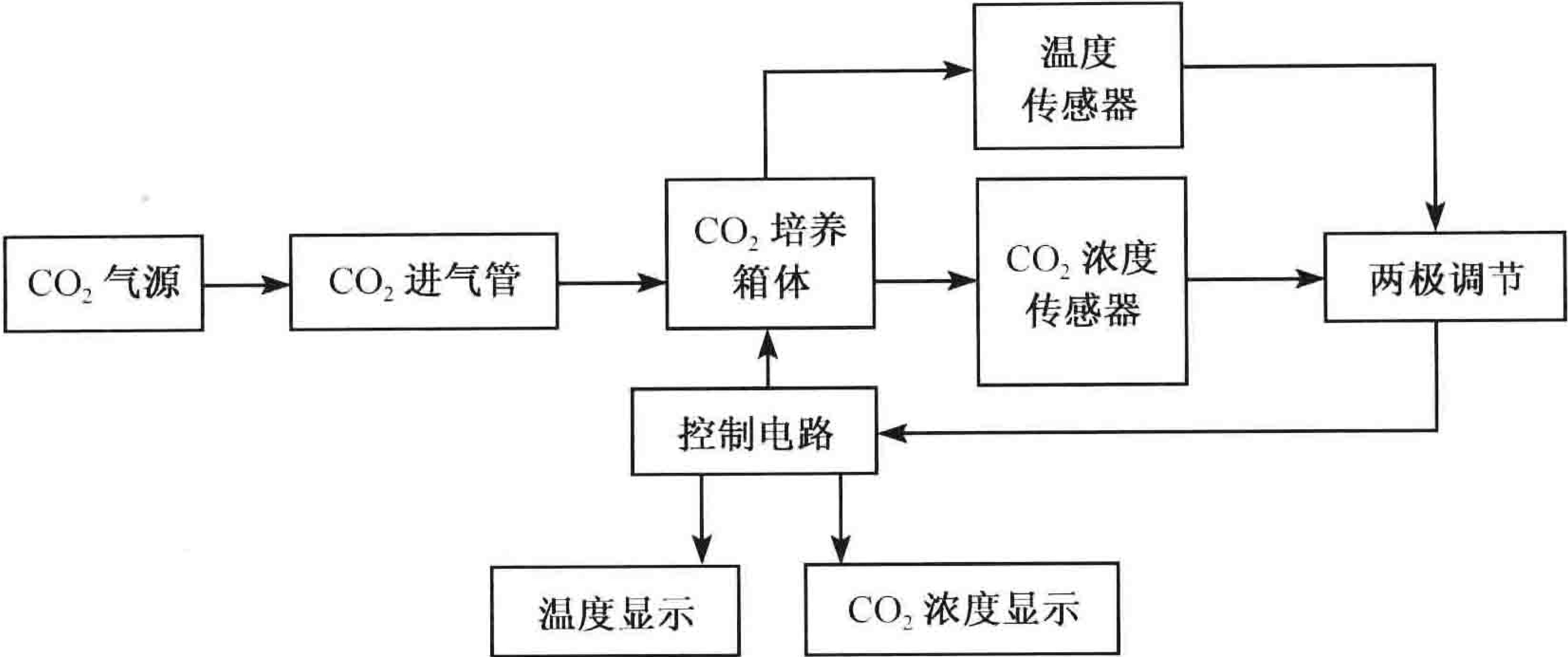


图 14-2　二氧化碳培养箱工作原理示意图

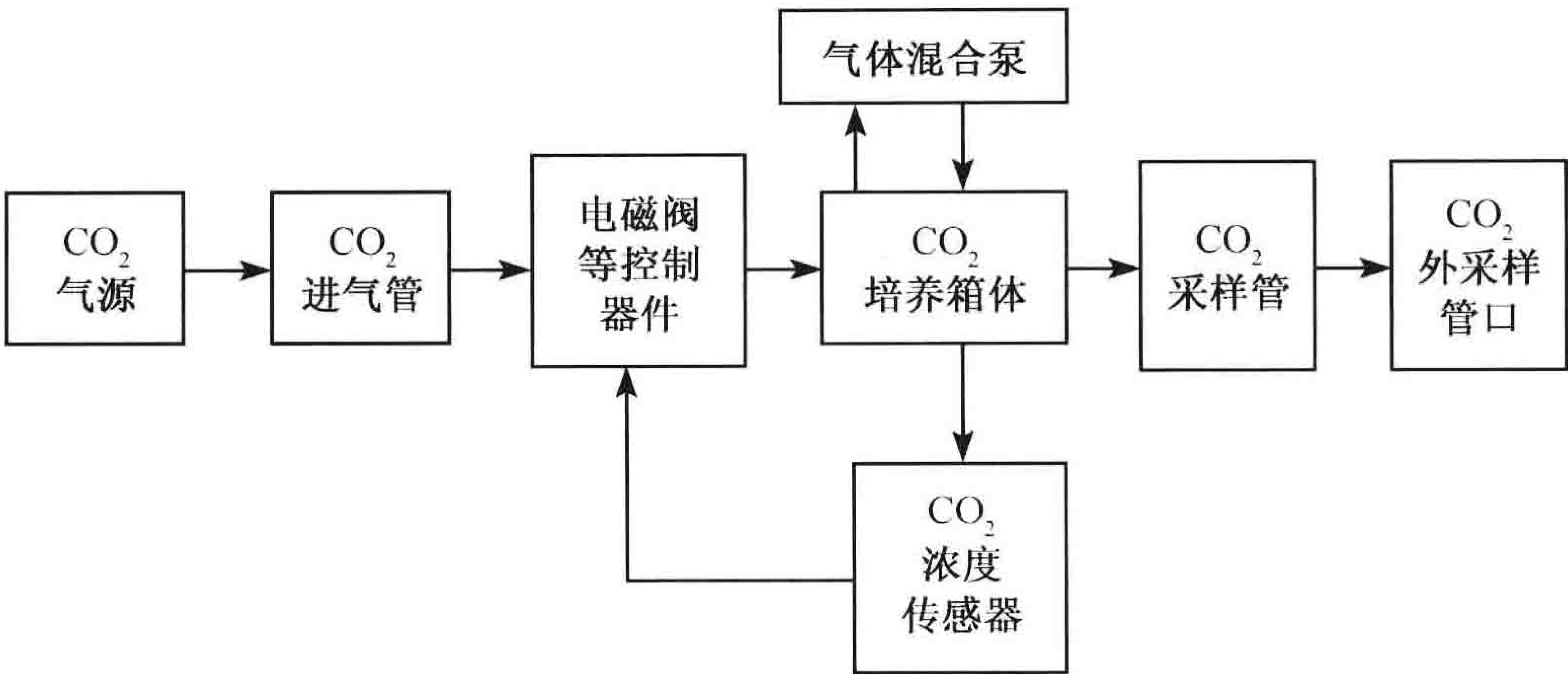


图 14-3　二氧化碳培养箱气体通路示意图

二、影响实验结果的因素

（一）二氧化碳浓度

细胞生存、代谢、增殖、分化的培养体系，首先需要稳定的 pH 环境。温度对二氧化碳气体在液体中的溶解度有较大影响，温度越高则溶解度越低。所以在室温条件已经调节过的液体培养基放在 37℃的培养箱里，其 pH 可能随温度升高而升高，其升高的程度与气液相的比例有关，经验值为 0.2～0.4。如果培养箱内植入培养的细胞，由于细胞呼吸产生二氧化碳，糖分解后产生乳酸。乳酸如果超出缓冲液体系中物质的中和能力，就会导致液相的 pH 下降。如果培养箱的浓度数字已显示达到 5%，但培养基仍不能维持理想的 pH，可能原因如下：培养箱中二氧化碳浓度数字与实际的浓度不符；培养箱门未关闭好；二氧化碳培养箱开门次数过多。

（二）湿度

如果二氧化碳培养箱内的水分蒸发消耗掉，所培养的细胞等就会停止生长或者死

亡，因此应该定期检查二氧化碳培养箱的湿度，并及时补充水分。

(三) 温度

根据所培养物的最适生长温度，确定最佳培养温度，过高或过低都会影响细胞生长；另外，温度也影响二氧化碳在液体的溶解度，温度增高，则溶解度降低，通过 pH 的波动会影响细胞生长。

第二节　实验设备

一、培养箱的校准

1. 温度的校准

1) 在培养箱内放置一个准确的玻璃管式水银温度计，以校准所设定的温度。同时，再放置一个准确的体温计，以校准极限温度。

2) 把温度旋钮调到所需温度 37℃。

3) 把极限温度旋钮调到最大。等待 24h，让仪器达到稳定。

4) 如果温度还没达到 37℃，再调整温度旋钮到 37℃，然后再等待 24h，让机器最后达到稳定。

5) 当培养箱温度稳定在 37℃后，按逆时针方向转动极限温度旋钮，直到该极限温度旋钮的指示灯明亮为止。

6) 小心将极限温度旋钮顺时针方向转动，直到指示灯刚好熄灭为止。注意：机器正常运转期间，其极限温度指示灯应保持熄灭状态。当箱内温度高于极限温度时，该指示灯点亮报警。如果面板液晶显示温度与箱内温度计读数不符，可进一步调整校准。首先，调整显示器点 (display pot)，直到读数与水银温度计的读数相吻合，等待数小时后让机器稳定。如果还不相符，可重复这一步骤，直到机器达到最终稳定。

2. 浓度的设定和校准

在二氧化碳供气系统接通之前，要先把水套灌满水并稳定温度。输入二氧化碳培养箱的进气压力不得超过 0.2MPa。

(1) 二氧化碳浓度零位的调整

1) 排完箱内二氧化碳，使培养箱在设定温度 37℃下达到稳定。

2) 用小螺丝刀调整零位 (zero) 调节器，直到二氧化碳显示读数为 0.0。

3) 关闭箱门，稳定 1h。

4) 再次调整零位调节器，直到二氧化碳显示读数为 0.1，以达到正常环境中二氧化碳含量。

(2) 二氧化碳跨程调节器 (CO_2 span adjustment)

调整数字显示与箱内二氧化碳实际浓度。

1) 把二氧化碳供气管道与培养箱接通，并把二氧化碳气瓶上的压力调节器调至

0.1～0.2MPa。

2）按下 Push to Read Point 键，不要松开，同时调 Turn to Set CO_2 Set Point（二氧化碳设定）旋钮，直到显示出的读数比实际需要（5%）低 2%，即 3%。

3）等待 1h，让培养箱达到稳定。用二氧化碳浓度检测仪检测二氧化碳浓度。

4）若不吻合，用一把小螺丝刀调整 CO_2 Span Adjustment（二氧化碳温度调节），使得二氧化碳显示浓度与二氧化碳浓度检测仪读数相吻合。

5）按步骤 2）操作，将二氧化碳显示浓度调至 4%。

6）重复步骤 4）、5），使得二氧化碳显示浓度与二氧化碳浓度检测仪读数相吻合。

7）将二氧化碳显示浓度调至 5%，等待 1h，让培养箱达到稳定，用二氧化碳浓度检测仪检测二氧化碳浓度，以保证机器显示读数与测定浓度相符。

二、日常维护保养

由于该类仪器经常与水和气体接触，气体内的杂质可能会进入气路管道，造成机器无法正常工作。日常工作中需要从以下几方面进行保养：经常检查水套的水位，如果水位低就要加水；定期检查二氧化碳气瓶，不能让二氧化碳气瓶用空；检查二氧化碳的供气管道和接口有无漏气现象；定期给机器除尘，防止灰尘阻塞气道及电磁阀。

注意事项：

1）初次使用一定要加充足的去离子水或蒸馏水，盖上密封盖，以减少水套内水的蒸发。

2）在供电不稳定的单位，最好为其配备高性能稳压器，以减少因电压不稳导致的故障。

3）在二氧化碳钢瓶上安装一个低压 0～0.25MPa 的二氧化碳减压阀，使输出气压较稳，这样可避免使用中因输入箱内二氧化碳压力过高，使二氧化碳控制阀长期处于工作状态而损坏。

4）在通电不做培养的情况下，应将温度设定为 0℃，将二氧化碳浓度设定为“0”，这样可使它们的控制阀处于不工作状态，从而避免控制阀长期处于工作状态而损坏。

5）门的温度要设置的比箱内温度高 1℃左右，以降低存取物品时箱内温度的波动。

6）在夏季室温较高的地区，室内最好安装空调。

三、故障排除

1. 故障现象

仪器报警，温度指示正常而二氧化碳浓度的指示值低于所设定的浓度值，二氧化碳气体的输入仍在进行。

2. 故障分析

培养箱如要正常工作，需要确保培养箱中的温度和二氧化碳的浓度正常。二氧化碳气体的输入是利用微电脑控制电磁阀的开合，当在控制面板上输入所需二氧化碳浓度

值，箱内的二氧化碳探测器根据二氧化碳气体的热导率，利用桥式电路平衡的原理来控制培养箱内的二氧化碳气体的含量。如果二氧化碳的浓度未达到所设定的指标，二氧化碳气体就会持续输入，这时桥式电路的电压是不平衡的，电磁阀处在开启状态。当箱内二氧化碳浓度达到所设定的二氧化碳浓度时，电桥达到平衡，控制电路就会控制电磁阀关闭，即切断二氧化碳气体的输入。箱内温度是通过控制加热器通断，来保持设定的工作温度。

3. 故障检修

先用复位键进行复位，如果故障仍未消除，需要拆下二氧化碳探测器和电磁阀进行检查，若有损坏需要修理或更换。若探测器未损坏且电磁阀开合正常，则需要检查二氧化碳气体控制电路和温度传感器，若二者都没有损坏，则可能是箱内风机转动不正常导致。对风机进行维修，重新安装后即可故障排除。由此可见，箱内二氧化碳浓度是否正常不仅取决于二氧化碳探测器及控制电路，箱内风机是否正常工作，而且对二氧化碳浓度的正确检测也至关重要。因为二氧化碳的密度大于空气，风机出现故障就会导致箱内二氧化碳和空气分层，导致二氧化碳探测器探测数值小于实际值，从而发生报警。

四、各种不同类型培养箱的性能特点

（一）日本三洋公司二氧化碳培养箱（MCO-15AC MCO-175）

性能特点：箱内空气感应方式实现了高精度温度环境；不受湿度影响的电子式小型除湿器和红外线感应器配合使用，实现了高精度的二氧化碳环境；周到的防污染构造；在开外门时，电动机、瓦斯阀自动停止，防止箱外空气混入；自动门加热器减少箱内和内门之间的温度差，防止造成污染；瓦斯回路装有高效率过滤器净化；内箱为全不锈钢 *R* 角（没有硬棱，角落圆滑）结构，清洁、消毒、灭菌极为方便。

（二）美国 SHELLAB 公司 2123-2 型二氧化碳培养箱（水套式）

性能特点：高效保温隔层，温控稳定，省电；具有温度、二氧化碳、声光报警装置；门加热装置可防止玻璃门污染，便于观察；具有二氧化碳气体双重过滤装置；配有不锈钢水套与搁板，腔内转角便于清洁。

第三节　二氧化碳培养箱的应用

二氧化碳培养箱是细胞、组织、细菌培养的一种先进仪器，是开展免疫学、肿瘤学、遗传学及生物工程所必需的关键设备，广泛应用于微生物、农业科学、药物学的研究和生产。现举例说明二氧化碳培养箱在生物学领域中的应用。

一、培养造血祖细胞

继造血祖细胞的概念提出之后，造血祖细胞的培养技术也得到了广泛的应用。造血

祖细胞的培养离不开二氧化碳培养箱的使用，培养箱的二氧化碳浓度、温度、湿度等条件也对造血祖细胞培养有重要影响。通过试验确定合适的培养条件，采取针对措施，就可以达到和维持理想的体外造血祖细胞的培养条件。

二、连续培养大量恶性疟原虫配子体

目前已经建立了在二氧化碳培养箱中连续培养大量恶性疟原虫配子体（G）的方法。该培养方法具有操作便捷且培养费用低、配子体分化率高且持续时间长、配子体比较成熟和红细胞回收率高等优点，为开展恶性疟原虫配子体的免疫学研究和阻断传播型疟疾疫苗的研究创造了条件。

二氧化碳培养箱是生物、微生物、病毒、遗传、生物制品、医学等科研、教育和生产部门不可缺少的实验室设备。目前涌现的新型全自动二氧化碳培养箱已经是集振荡、二氧化碳浓度、温度、湿度于一体，且可以和多种机械臂联用的多功能性仪器。在攻克了其振荡自热、振荡自密的技术难题后，二氧化碳培养箱也将会有更大的发展和更广阔的应用的前景。

主要参考文献

曹枫，骆玮，姜北生等. 2003. 二氧化碳培养箱工作原理、校准及日常保养. 医疗设备信息，(12)：24～25

仇宝跃. 2003. 美国 Forma 二氧化碳培养箱故障检修一例. 医疗卫生装备，(10)：278

董杰. 2002. 美国 SL TC2323 二氧化碳培养箱的使用及维护. 齐齐哈尔医学院学报，(8)：945

李娟，罗绍凯，彭爱华等. 1998. 二氧化碳培养箱影响造血祖细胞培养条件的分析及其对策. 现代医学仪器与应用，(1)：18～19

许学年，冯正，杨柏林等. 1998. 应用二氧化碳培养箱连续培养大量恶性疟原虫配子体. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，16 (5)：376～379

Ponnudurai T，Meuwissen J H，Leeuwenberg A D et al. 1982. The production of mature gametocytes of Plasmodium falciparum in continuous cultures of different isolates infective to mosquitoes. Trans R Soc Trop Med Hyg，76 (2)：242～250

第十五章　智能人工气候箱

在生物学、农业、医疗卫生等生产科研领域，为保证某些生物的必要生活条件以及室内观察生物的生长发育情况，需要有一种设备来模拟各种小气候环境。按这一要求研制出的人工气候箱是由电脑控制，具有光照、冷热恒温、自动控制（加湿、除湿）昼夜自动切换程序和超温保护等5大功能的生物培养实验设备，可用于植物种子发芽、育苗、植物周期栽培、微生物培养、昆虫和小动物的饲养等实验。如图15-1为一人工气候箱外形图。



图15-1　宁波莱福科技有限公司智能可编程型人工气候箱 PQX-280\330
（来自 www.bio-equip.com）

第一节　基本原理

人工气候箱以生物或工农业产品为供试对象时，气候三要素（温度、湿度和光照）对供试对象的生长、发育或品质性能影响很大，要求设备具有在一定技术指标范围内能够长时间稳定工作的能力。人工气候箱的控制参数主要分温度、湿度及光照度三部分。一般根据无人值守连续运行的要求设计，只要分别设定好所需湿度设定值、白天（光照）的经历时间和温度、黑夜（无光照）的经历时间和温度，电脑就会按该循环规律进行程序控制。若运行中出现停电现象，则恢复供电后会自动补时，并能分别记录下白天和黑夜的停电次数。

一、温度控制

温度是一个重要参数，温度的波动会导致系统性能降低。一般采用制冷与加热配合使用的办法，当测量温度高于设定温度时，由继电器输出端控制压缩机制冷；当测量温度低于设定温度时，由双向可控硅控制电热管加热。

二、湿度控制

湿度控制涉及除湿与加湿两方面。当压缩机工作时，制冷系统中的蒸发器就降温，而蒸发器周围的气态水分就会凝结成液态水除掉，从而达到除湿的目的。加湿采用外接超声波雾化器的办法。除湿与加热是相对矛盾的，因为除湿实际上也是一个制冷的过程，单纯除湿势必造成降温。因此，应考虑加热与制冷的功率匹配问题。光照度专指在白天时间段的光照强度，黑夜时间段的光照度不作考虑。光照度由所接通的日光灯的数量决定。

第二节　实验仪器

一、组成结构

该类仪器一般由气候箱箱体和加湿器两部分组成。

1. 箱体结构

箱体由顶罩、工作室、供冷供热室和底室四部分组成。顶罩内装有电脑控制器，顶罩面板上装有数码显示器、指示灯和操作开关。顶罩两侧分别装有一排日光灯插座，顶罩后侧装有温度信号输出插座，供测试或接记录仪。工作室为三面中空玻璃结构，其中左右两侧为三层中空玻璃，外侧的上边框分别挂有一组光照日光灯，工作室后板上中部有一个带盖换气孔。底室右侧板上装有加湿进气管和控制加湿器工作与否的控制电压三芯插座。工作室后壁上装有电阻，即温度传感器。箱门分上、下两扇中空玻璃门，边衬垫为磁性胶条与箱体密封。供冷供热室在工作室下方，其左右分别与工作室通风道的出入口相连，室内装有蒸发器、电热管和循环风扇，向工作室供热或供冷。风道入口处装有湿度传感器，底室底正面板上装有湿度控制器。底室装有压缩机、冷凝器、冷却风扇、仪器进线接线盒和熔断器。

2. 加湿器

超声加湿器是一种具有断水自动保护功能、以超声波为动力的冷态蒸汽发生器，由底座、水箱/产气管联体、出气管三部件组成。

3. 面板结构

该类仪器一般可显示以下参数：湿度设定值和湿度测量值、所处周期（即第几天）、所处时段（白天或黑夜）、白天（有光照）时段的温度和经历时间设定值、黑夜（无光照）时段的温度设定值和经历时间设定值、箱内温度、现时段（白天或黑夜）所剩余时间、白天和黑夜分别累计停电次数。

二、不同型号仪器的性能特点

1. 加拿大 CONVIRON 人工气候箱 Reach-in Plant Growth Chamber

该型号仪器采用先进的 CMP4030 微处理器，触摸屏软件操作，程序可连接，实现数月自动控制，并实时图形监测。光照强度选择范围为 35 000～124 000lx。温度范围为 4～45℃，并可实现低温（－10℃）和高温控制，控制精度：＋/－0.5℃。湿度范围为从环境湿度至相对湿度 90%，控制精度为相对湿度＋/－3%。采用风冷和水冷两种冷却方式。

2. 宁波莱福科技有限公司智能人工气候箱 PQX-280\330

PQX 系列智能人工气候箱采用微电脑可编程控制方式，可设置多种参数（包括温

度、湿度、光照度）来模拟自然气候。具有断电记忆、断电时间自动补偿功能。采用恒温控制系统，响应快、温控精度高。采用超声波加湿，湿度均匀。风道式通风，工作室风速柔和。光照能力可达到 35 000lx。适用于植物种子发芽、栽培和育苗，昆虫、小动物饲养以及木材、建材的性能实验等。

第三节　仪器的操作使用

一、操作方法

插上电源，按下面板上的电源开关，数字显示窗内即显示出各种运行参数。

1. 白天黑夜切换

按下“切换”键，使原来为白天时段切换成黑夜；原为黑夜则转变为白天。

2. 运行中减时

为与当地时间同步，开机后需要减时，每按一次减时键则现时段剩余时间减少 1h，直减至与当地时间大致吻合。请注意，减时不影响下一程序的时段设定值。

3. 实现全部白天（黑夜）的方法

将黑夜时段的历时设定为零，则永远为白天（光照），反之亦然。白天、黑夜历时设定值均为零时，不能正常工作，这时时段和温度设定值均无显示，时间窗内显示出 END（结束）字样。

4. 黑夜时段的照明

按入面板上的照明按钮，左边灯罩内的日光灯发亮，供照明用。不用照明时须将该按钮按出。

5. 运行中设定参数的检查

逐次按设定/检查键，数字显示窗上依次显示出白天时段设定温度和历时设定值、黑夜时段设定温度和历时设定值、白天累计停电次数、黑夜累计停电次数、运行周期、现时段工作状态。检查完毕，应最后回到现时段工作状态。请注意：第一次开机时周期数为 1，当黑夜切换到白天时周期数增加 1。但按“白天/黑夜切换”键造成切换时周期不变，即不计数。

6. 加湿器使用方法

先加水，然后与人工气候箱汽路连接，再与电器连接。

二、故障排除

1）若不制冷时噪音大，该噪音源在工作室下方的供冷供热室中的循环风扇的振动。

有以下几种可能：工作室下层塑料托盘固定螺丝松动；导风板未嵌入槽内；供冷供热室的盖板螺丝松动；电热管支架螺丝松动；风扇被异物缠住等。

2）若制冷机工作时噪音大于70dB，应先将箱底下的积水盘摆正，或将其抽出放在地上，然后将四个轮子垫平。如无效果则拆下底室护板检查压缩机和冷却风扇。

3）若日光灯不亮多为灯脚未摆正，也有可能是垫子镇流器坏损。

4）人工气候箱加湿指示灯亮时无雾气，可将加湿器电源插头插在其他220V的电源上，以辨别加湿器本身是否有故障；若有电源而指示灯不亮又无雾，则保险丝断；若有雾无风，则风扇故障；若有风无雾则可能为换能片结垢，须用软毛刷清洗或者缺水，应加水。若加湿器正常，则可能为塑料软管积水而阻塞，需调整好管子走向，或更换软管。若加湿指示灯亮而加湿器插座无电源，则属气候箱本身故障。

三、使用注意事项

人工气候箱进行的实验大多数是持续时间长和设置多个循环，所以保证设备安全和在低成本情况下持续运行尤为重要。

1）人工气候箱安装要符合安全规程，特别是电气安全规程。设备需设置短路保护、过流保护、缺相保护、漏电保护，并安装接地保护以保证设备及操作人员的安全。

2）为了确保实验的准确和实验样品的安全，使用人工气候箱应设置极限温度保护，以防设备在运行中出现故障、温度超过极限。如果超过极限设备立刻停止运行并报警，及时加以保护，以保护实验样品的安全。一般实验的极限温度保护值为实验设定值的±3℃，精确的实验保护值为设定值的±1.5℃，甚至更加严格。

3）一些特殊的实验（如细菌、微生物的保种、繁殖）要装设停电报警系统，特别是需要在低温下保留物种的实验箱体中，以防突然停电损坏实验样品，并提醒实验人员对箱体内样品进行处理及采取相应措施。

4）在使用过程中对设备进行技术革新。设备运行中出现不足之处时，即使是进口的先进设备也应改进其不合理部分。为了使设备能持续安全运行，确保实验顺利进行，需要对设备不足之处进行技术改造。

5）建立健全的维修保养制度，对设备进行定期维修保养。每天实验工作人员对设备进行巡视、监控，发现故障，及时排除，严禁设备带故障运行。每个实验完成后对设备进行维修保养，以备下次实验使用。建立每3个月对设备进行小修保养，每年对设备进行大修保养制度。把设备的损坏、损耗降到最低程度。

此外还应注意以下事项：

a. 光照箱搬运时，倾角不得大于45°，以免制冷机损坏。

b. 避免激烈颠震和撞击，以免玻璃门壁破碎。

c. 开箱取件要小心，防止碰碎玻璃门壁和塑料件。

d. 光照箱应远离电磁干扰源，并应将光照箱的地线接地。

e. 日光灯罩的四枚挂钉兼作光照箱顶盖的固定螺钉，因此若要拆下顶盖，须先旋下这四枚螺钉以免损坏箱子。

f. 电源电压低于180V的场合需另配交流稳压器。

g. 加湿器中应使用40℃以下的清洁水；水箱盖不可漏水以免损坏底座内的电器；环境温度应在1～45℃；应水平放置在地上，塑料软管不可折叠下垂；使用一段时间后需清洗，但不可用硬物擦刮换能片；储藏时应先洗净、擦干、晾干；内有高压，非专业人员请勿随意打开底座内的器件。

第四节　人工气候箱的应用

一、在无公害生物农药生产方面的应用

中山大学生物防治国家重点实验室与广州中达生物农药公司合作，使用自行设计的人工气候室，把室内环境严格控制在28℃，相对湿度75%，光照度10 000lx，光周期12L。12L的条件下，用于大量繁殖饲养斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、小菜蛾和菜青虫等昆虫，并使它们感染病毒，提取这些昆虫病毒，生产无公害生物农药“虫瘟一号”、“虫瘟二号”。

二、在农业防治病虫害科研实验的应用

温度、湿度、光照等环境因素对昆虫的生长、繁殖有着重要的影响。通过人工气候箱对昆虫在各种气候环境下的生长、繁殖做科研实验、探索，研究其生长繁殖规律，用以指导、防治及消灭害虫，具有重要意义。

三、在环境实验等其他方面的应用

人工气候箱在其他方面应用也很广泛，如在医学、微生物学方面进行细菌、病毒的培养及留种；在昆虫学方面，对昆虫的繁殖、保种以及病虫害防治等方面的研究。

第五节　智能人工气候箱的发展

人工气候箱应用比较广泛，如高株植物和多量样品的培养，就需要内部容积较大的培养箱。目前已经出现大容量智能型人工气候箱，克服了传统小型气候箱因体积过小带来的不便，且若干台群控即可代替人工气候室。另外智能人工气候箱的软件控制也有了进一步的发展，除了使用微电脑进行全自动控制外，还可进行多段编程，通过编程来控制每一周期中的温度、湿度、光照值，克服了传统人工气候箱白天、黑夜只能设置单一温度、湿度、光照度的缺点。

主要参考文献

马坚勇. 2003. 智能型人工气候箱控制系统的研制. 自动化与仪表，(3)：40～42
吴海昌，杨沛，张穗屏. 2002. 人工气候箱——环境技术的应用. 环境技术，(2)：2～6

第十六章　冻　干　机

冷冻干燥技术曾是一项商业技术，由于它可以使物质失去化学活性而保持生物活性，二战期间曾用于对血液、青霉素和骨头的处理上，而今已成为生物领域中对样品进行保存的一项及其重要的技术。其应用涉及药学、诊断学、水质保护、病毒和细菌培养、组织制备、生产人工合成皮肤等领域。冷冻干燥包括化学处理、前处理、冷冻、初级干燥和次级干燥 5 个过程。

冷冻干燥的主要优点如下：

1）冷冻干燥在低温下进行，因此对许多热敏性物质特别适用，如蛋白质、微生物之类不会发生变性或失去生物活力，因此在医药上应用广泛。

2）低温干燥时，物质中一些挥发性成分损失较少，适合一些化学产品、药品和食品的干燥。

3）在冷冻干燥过程中，微生物的生长和酶的作用无法进行，因此能保持原来的性状。

4）冻干状态下进行物质干燥，体积几乎不变，因此保持了物质原有结构，不会发生浓缩现象。

5）干燥后的物质疏松多孔，呈海绵状，加水后迅速完全溶解，几乎立即恢复原来的性状。

6）由于干燥在真空下进行，氧气极少，从而保护了一些易氧化的物质。

7）干燥能去除 95％～96％以上的水分，使干燥产品能够长期保存而不致变质。

冷冻干燥适合于活性蛋白质样品的干燥与结晶。提纯后的蛋白质，如酶、膜蛋白、脂蛋白、免疫球蛋白、抗原和抗体等样品溶液，由于量大且不易保存，所以应进行干燥制成干品，更易于保存且不易变质。

第一节　基本概念与基本原理

一、基本概念——共熔点及其测定方法

需要冻干的样品，一般是预先配制成水溶液或悬浊液，因此其冰点就与水不相同了。例如，海水是多种物质的水溶液，而海水要在低于 0℃的温度才结冰。实验表明，溶液的冰点低于溶剂的冰点。另外，溶液的结冰过程与纯液体也不一样，纯液体有一个固定的结冰点，而溶液却不在某一固定温度完全凝结成固体，而是在某一温度时，晶体开始析出，随着温度的下降，晶体的数量不断增加，直到最后，溶液才全部凝结，因此溶液并不是在某一固定温度时凝结，而是在某一温度范围内凝结。冷却时开始析出晶体的温度称为溶液的冰点，而溶液全部凝结的温度称为溶液的凝固点。因为凝固点就是熔

化的开始点（即熔点），对于溶液来说也就是溶质和溶剂共同熔化的点，所以又称作共熔点。由此可见溶液的冰点与共熔点是不相同的，共熔点才是溶液真正全部凝结成固体的温度。

共熔点的概念对于冷冻干燥十分重要，因为冻干产品可能含有盐类、糖类、明胶、牛奶、蛋白质、血细胞、组织、病毒、细菌等物质，因此是一个复杂的体系，其冻结过程肯定也较为复杂，有一个真正全部凝结成固体的温度，即共熔点。由于冷冻干燥是在真空状态下进行，只有产品全部冻结后才能升华，否则有部分液体存在时，在真空下不仅会迅速蒸发，造成液体浓缩，使冻干产品体积缩小；而且溶解在水中的气体在真空下会迅速冒出来，造成类似液体沸腾的样子，使冻干产品鼓泡。为此冻干产品在升华开始时必须要冷却到共熔点以下的温度，才能达到真正全部冻结。

在冻结过程中，从外表观察来确定产品是否完全冻结是不可行的，而靠测量温度也无法确定产品内部的结构状态。随着产品结构发生变化，产品的电性能也发生了相应的变化，特别是在冻结时电阻率的测量能使我们知道冻结是否完成。全部冻结后电阻率将非常大，因为溶液是离子导电，冻结时离子将固定不能运动；而有少量液体存在时电阻率将显著下降。因此测量产品的电阻率将能确定产品的共熔点。

正规的共熔点测量法是将一对铂电极浸入液体产品之中，并在产品中插一温度计，把它们冷却到－40℃以下的低温，然后将冻结产品慢慢升温。用惠斯顿电桥来测量其电阻，当发生电阻突然降低时，这时的温度即为产品的共熔点。电桥要用交流电供电，因为直流电会发生电解作用。整个过程由仪表记录。共熔点的数值从－40℃到0℃不等，与产品的品种、保护剂的种类和浓度有关。

二、基本原理

干燥作为保持物质不腐败变质的方法之一，有很多种处理方式，如晒干、煮干、烘干、喷雾干燥和真空干燥等，但这些干燥方法都是在0℃以上或更高的温度下进行的，干燥所得到的产品一般体积缩小、质地变硬，甚至有些物质发生了氧化，一些易挥发的成分大部分会损失掉，而一些热敏性的物质如蛋白质、维生素会发生变性，微生物会失去活力，且干燥后的物质不易在水中溶解，因此干燥后的产品与干燥前相比在性状上有很大的差别。而冷冻干燥是最普遍的一种干燥形式，它与其他干燥处理的不同之处在于物质是在冷凝状态和真空状态下脱水。

冷冻干燥就是将含有大量水分的物质预先进行降温冻结成固体，然后在真空条件下使水蒸气直接从固体中升华出来，而物质本身留在冻结时的冰架中，因此干燥后体积不变且疏松多孔。冰在升华时要吸收热量，引起产品本身温度的下降而减缓升华速度。为了增加升华速度、缩短干燥时间，必须要对产品进行适当加热，即在处理后期，为了进一步降低产品的残余水分含量，让产品升到0℃以上，但一般不超过40℃。

冷冻干燥过程实际上是水的物态变化及其转移过程。含有大量水分的制品首先冻结成固体，然后在真空状态下固态冰直接升华成水蒸气，水蒸气又在冷凝器内凝华。干燥结束后冰霜熔化排出，在冻干箱内得到所需冷冻干燥产品，干燥过程如图16-1所示。

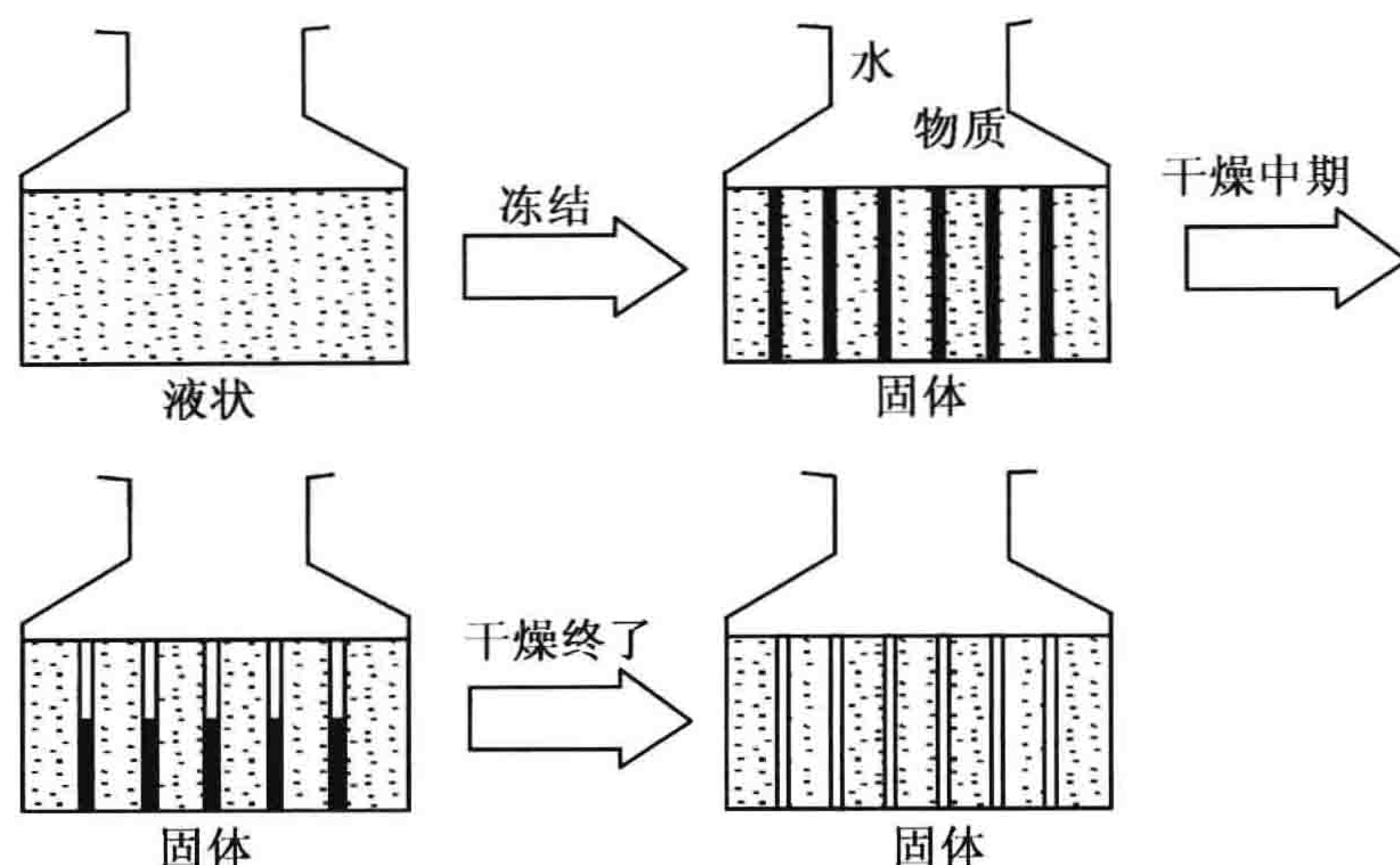


图 16-1　冻干机的干燥过程图

冻干过程中有两个放热过程和两个吸收过程：液体制品放出热量凝固成固体制品；固体制品在真空下吸收热量升华成水蒸气；水蒸气在冷凝器中放出热量凝华成冰霜；冻干结束后冰霜在冷凝器中吸收热量熔化成水。

三、影响因素

整个冷冻干燥过程中进行热量和质量的传递。热量的传递贯穿于冷冻干燥的全过程。预冻阶段、干燥的第一阶段和第二阶段及化霜阶段均进行着热量的传递；质量的传递仅在干燥阶段进行，冻干制品产生的水蒸气到冷凝器内凝华成冰霜的过程，实际上也是质量的传递过程。只有发生了质的传递，产品才能获得干燥。在干燥阶段，热的传递是为了促进质的传递，改善热的传递也能改善质的传递。

如果在产品的升华过程中不提供热量，那么产品由于升华吸收自身的热量而使温度下降，升华速率也逐渐下降，直到产品温度相等于冷凝器的表面温度，干燥便停止进行。这时从冻结产品到冷凝器表面的水蒸气分子数与从冷凝器表面追回到冻结产品的水蒸气分子数相等，冻干箱与冷凝器之间的水蒸气压力差等于零，达到平衡状态。

如果一个外界热量加到冻结产品上，这个平衡状态就会被破坏，导致冻结产品的温度高于冷凝器表面的温度。冻干箱和冷凝器之间便产生了水蒸气压力差，形成了从冻干箱流向冷凝器的水蒸气流，由于冷凝器制冷的表面使水蒸气凝结为冰霜，使冷凝器内的水蒸气不断被吸附，冷凝器内便保持较低的水蒸气压力；而冻干箱内流走的水蒸气又不断被产品中升华的水蒸气补充，维持冻干箱内较高的水蒸气压力，这一过程的不断进行，使产品逐步得到干燥。

升华首先从产品的表面开始，在干燥进行了一段时间之后，在冻结产品上面形成了一层已经干燥的产品，产生了干燥产品与冻结产品之间的交界面，交界面随着干燥的进行不断下降，直到升华完毕交界面消失。当产生了交界面之后，水分子要穿越这层已经干燥的产品才能进入空间；水分子跑出交界面之后，进入已经干燥产品的某一间隔内，可能还要穿过许多这样的间隔后，才能从产品的缝隙进入空间，也可能经过一些转折又

回到冻结产品之中，干燥产品内的间隔非常复杂，犹如迷宫一般。

当水分子跑出产品表面以后，它的运动路径还很曲折，可能与玻璃瓶壁、玻璃瓶上的橡皮或冻干机的金属板壁碰撞，也经常发生水分子之间的互相碰撞，方能进入冷凝器内。当水分子与冷凝器的制冷表面发生碰撞时，由于该表面的温度很低，低温表面吸收了水分子的能量，这样水分子失去动能，没有能量再离开冷凝器的制冷表面，便被“捕获”了。大量水分子被捕获后在冷凝器表面形成了一层冰霜，这样就降低了系统内的水蒸气压力，使冻干箱的水蒸气不断地流向冷凝器。随着时间的延长，冻干箱内不断对产品进行加热以及冷凝器的持久工作，产品逐渐得到了干燥。

干燥的速率与冻干箱和冷凝器之间的水蒸气压力差成正比，与水蒸气流动的阻力成反比。水蒸气的压力差越大，流动阻力越小，则干燥的速率越快。水蒸气的压力差取决于冷凝器的有效温度和产品温度的温度差，因此要尽可能地降低冷凝器的有效温度和最大限度地提高产品的温度。

水蒸气的流动阻力来自以下几个方面：

1）产品内部的阻力。水分子通过已经干燥的产品产生的阻力，这个阻力的大小与干燥层的结构和产品的种类、成分、浓度、保护剂等有关。

2）容器的阻力。容器的阻力主要来自瓶口，因为瓶口处截面积较小，瓶口处可能还有某些其他物品如带槽的橡皮塞、纱布等造成阻力。总之，瓶口截面积越大则阻力越小。

3）机器本身的阻力。主要是冻干箱与冷凝器之间管道的阻力，管道粗、短、直则阻力小。另外阻力还与冻干箱和冷凝器的结构和几何形状有关。

提高冻干箱内产品的温度，能增加冻干箱内的水蒸气压力，加速水蒸气流向冷凝器，加快质的传递，提高干燥速率。但是提高产品的温度是有限的，不能超过产品的共熔点。

降低冷凝器的温度，也就降低了冷凝器内水蒸气的压力，也能加速水蒸气从冻干箱流向冷凝器，同样能加快质的传递，提高干燥速率。但是较大幅度降低冷凝器的温度需增加投资和运行费用。

减少水蒸气的流动阻力也能加快质的传递，提高干燥速率。减小产品的分装厚度；合理地设计瓶、塞，减少瓶口阻力；合理地设计冻干机，减少机器的管道阻力；选择合适的浓度和保护剂，使干燥产品的结构疏松多孔，减少干燥层的阻力；试验最优的预冻方法，造成有利于升华的冰晶结构等。这些方法均能促进质的传递，提高干燥速率。

第二节 组成结构

一、基 本 机

产品的冷冻干燥需要在一定装置中进行，这个装置叫做冷冻真空干燥机，简称为冻干机。冻干机按系统可分为制冷系统、真空系统、加热系统和控制系统四个主要部分。按结构可分为冻干箱（或称干燥箱）、冷凝器（或称水汽凝集器）、冷冻机、真空泵和阀

门、电气控制元件等组成。图 16-2 是冻干机组成示意图，图 16-3 是个简易冻干机。

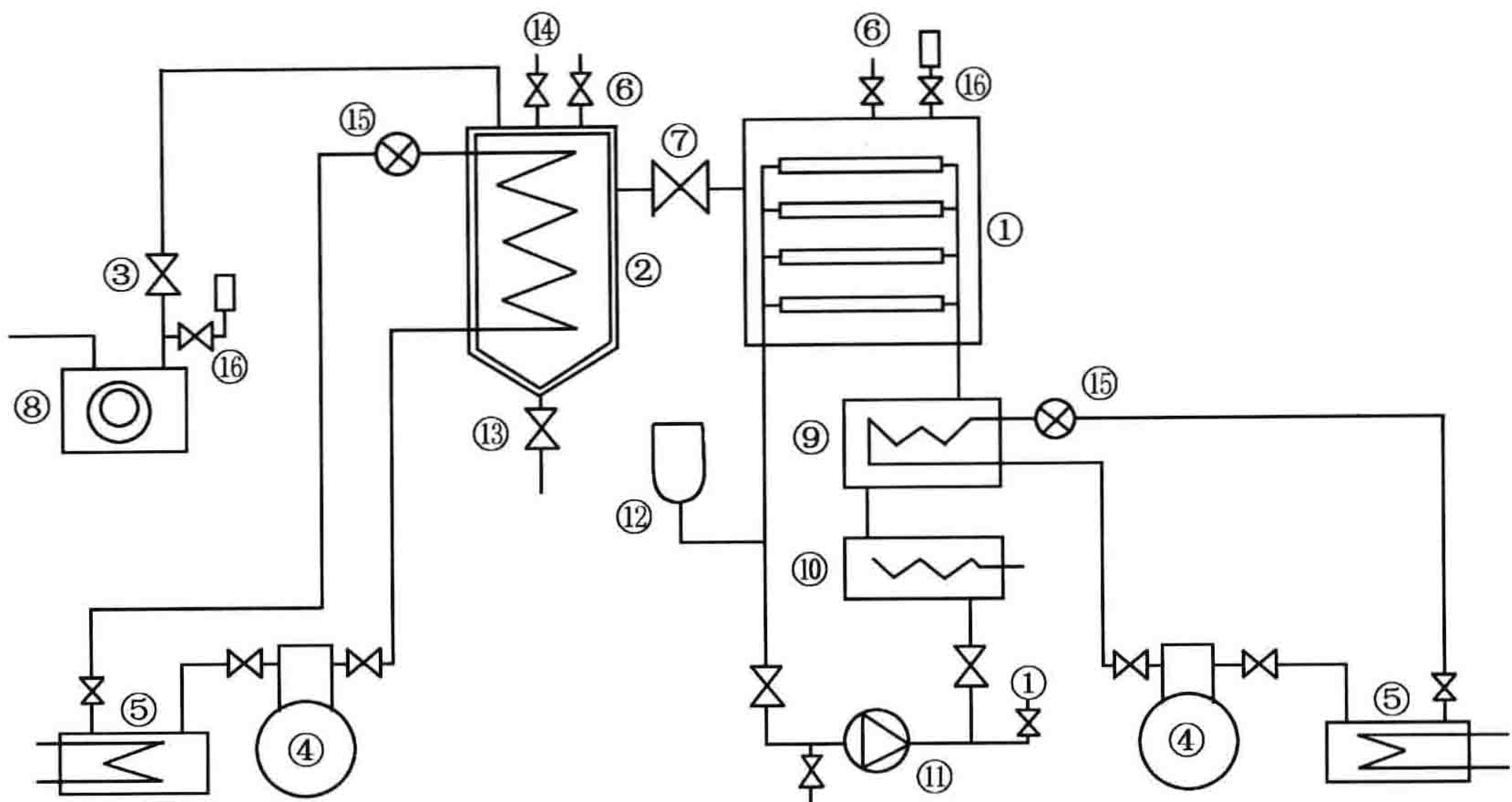


图 16-2　冻干机组成示意图

1. 冻干箱；2. 冷凝器；3. 真空泵；4. 冷冻机；5. 水冷冷凝器；6. 放气阀；
7. 冻干箱冷凝器阀；8. 真空泵冷凝器阀；9. 冷交换器；10. 电加热器；
11. 循环源；12. 膨胀容器；13. 排出阀；14. 除霜阀；15. 膨胀阀；16. 真空测量头

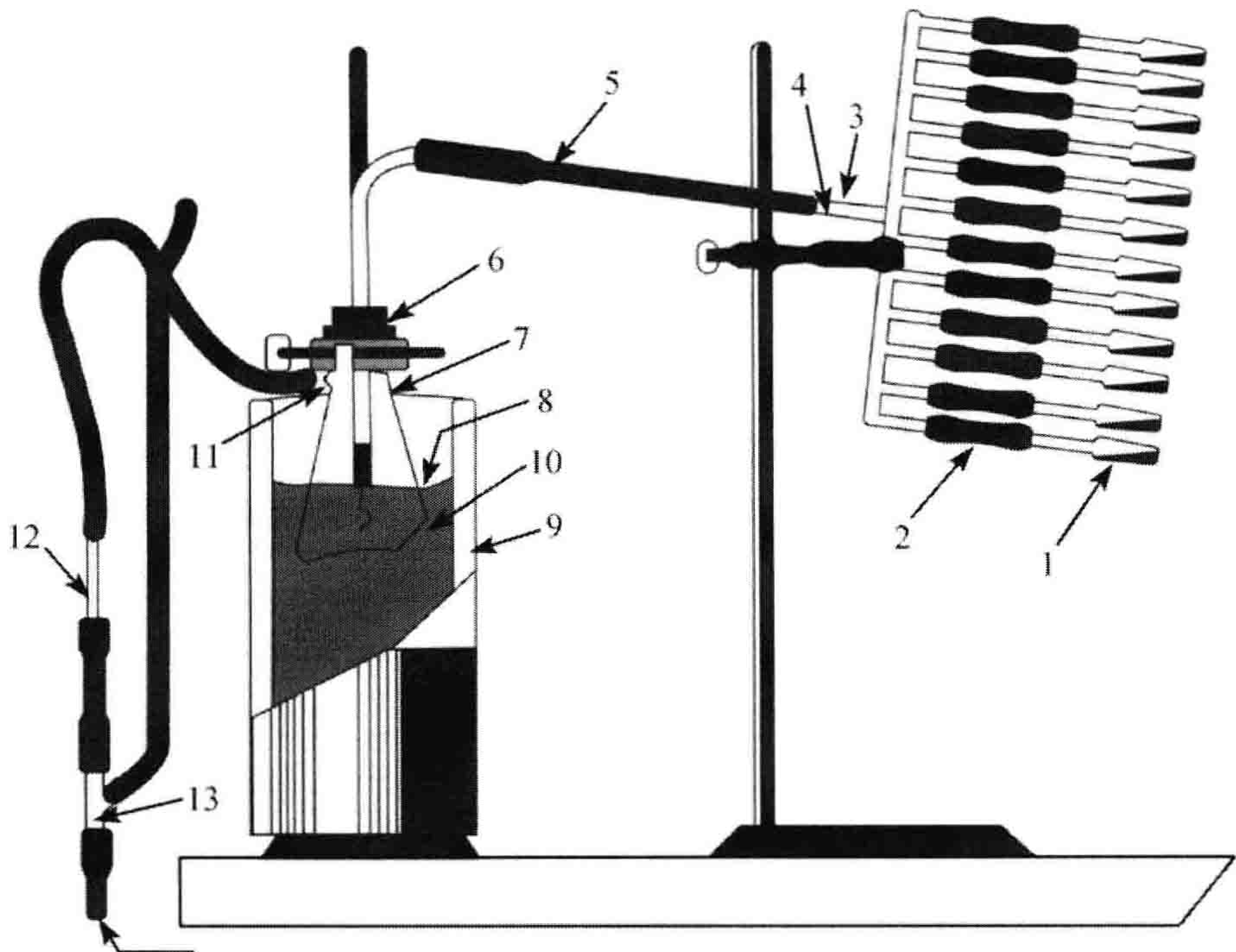


图 16-3　冰冻悬液真空快速干燥简易装置

1. 含有冰冻悬液的玻璃瓶和安瓶；2. 连接玻璃管和安瓶管的橡皮管；
3. 有 12 个插口的并联金属或玻璃分支管；4. 抽气口；5. 连接抽气口与
玻璃弯管的真空橡皮塞；6. 橡皮塞；7. 冷凝抽滤瓶；8. 冷冻剂（干冰
和乙醇）－78℃；9. 广口保温瓶；10. 冷冻抽吸过来的水分；
11. 抽应瓶出口；12. 棉花过滤器；13. 三通，一头接真空泵，一头接真空计

冻干箱是一个能够制冷到－40℃左右、加热到50℃左右的高低温箱，也是一个能抽成真空的密闭容器。它是冻干机的主要组成部分，需要冻干的产品就放在箱内分层的金属板层上，对产品进行冷冻，并在真空下加温，使产品内的水分升华而干燥。

冷凝器同样是一个真空密封容器，在它的内部有一个较大表面积的金属吸附面，吸附面的温度能降到－40℃以下，并且能恒定地维持这个低温。冷凝器的功能是把冻干箱内产品升华出来的水蒸气冻结吸附在金属表面上。

冻干箱、冷凝器、真空管道和阀门，再加上真空泵，便构成冻干机的真空系统。真空系统要求没有漏气现象，真空泵是真空系统建立真空的重要部件，真空系统对于产品的迅速升华干燥是必不可少的。

制冷系统由冷冻机与冻干箱、冷凝器内部的管道等组成。冷冻机可以是互相独立的几套，也可以合用一套。冷冻机的功能是对冻干箱和冷凝器进行制冷，以产生和维持它们工作时所需要的低温，它有直接制冷和间接制冷两种方式。

加热系统对于不同的冻干机有不同的加热方式。有的是利用直接电加热法；有的则利用中间介质来进行加热，由一台泵使中间介质不断循环。加热系统的作用是对冻干箱内的产品进行加热，以使产品内的水分不断升华，并达到规定的残余水分要求。

控制系统由各种控制开关指示调节仪表及一些自动装置等组成，可以较为简单，也可以很复杂。一般自动化程度较高的冻干机控制系统较为复杂。控制系统的功用是对冻干机进行手动或自动控制，操纵机器正常运转以冻干出合乎要求的产品来。

二、冻干机附件

（一）箱内压塞装置

产品在冻干箱内干燥完毕之后，需要开箱取出产品，并且要把干燥的产品进行密封保存。由于冻干箱内在干燥完毕时仍处于真空状态，因此产品出箱前必须放入空气，才能打开箱门，取出产品。放入的空气应是无菌干燥空气。

由于产品的保存要求各不相同，因此出箱时的处理也各不相同。有些产品仅需放入无菌干燥空气，然后出箱密封保存即可；有些产品需充氮保存，在出箱时放入氮气，出箱后，再充氮密封保存；有些产品需真空保存，在出箱后再重新抽真空密封保存。

干燥的产品一旦暴露在空气中，很快会吸收空气中的水分而潮解，特别是在潮湿的天气，使本来已干燥的产品又增加含水量。因此，产品一出箱就应迅速封口，如果因数量多而封口时间过长，应采取适当措施，或分批出箱，或转移到另一个干燥柜中。

冷冻干燥的产品由于是在真空下干燥的，因此受氧气的影响很少，在出箱时由于放入空气，空气中的氧气会立即侵入干燥产品的缝隙中，一些活性的基团会很快与氧结合，对产品产生不利影响，即使再抽真空也无济于事，因为这是不可逆的氧化作用。如果出箱时放入惰性气体如氮气，出箱后氧气就不易侵入产品的缝隙，然后再用氮气赶走产品容器内的空气再进行封口，则产品受氧损害的程度能够减轻。

最根本解决干燥产品受空气中水分和氧气影响的办法是采用箱内压塞的办法。该方法需采用有特殊装置的冻干箱和特制的瓶和塞互相配合，塞子需稳定地放置在瓶子之

上，但并未塞紧，而是塞上一半，俗称为半加塞。由于塞子上有一些可通气的缺口或小孔，因此并不影响冰的升华，在产品干燥完毕之后，可以在真空下或在放入惰性气体的情况下开动冻干箱的机械装置使整箱的塞子全部压紧，然后放入空气后出箱，再将瓶塞压上铝帽或封蜡，密封性会更好。

箱内压塞的机械装置是在冻干箱内特殊设计的，按压塞的动力不同可分为液压和气压两种。液压有手动液压和电动液压两种，手动液压是利用手压千斤顶，借千斤顶的力量来压入塞子；电动液压是借助马达。气压有压缩空气和真空负压两种，压缩空气是利用空压机的压缩空气力量来压入塞子；真空负压是利用冻干箱的真空状态，把外界空气放入箱内的特殊橡皮口袋，使橡皮口袋在真空下膨胀产生压力来压塞。根据设计的不同，冻干箱内的板层又分为固定式和活动式两种，固定式设计中冻干箱内放置产品的板层不动，另有一块可上下活动的板来压塞子；活动式设计中冻干箱内放置产品的板层可上下活动，压塞子也靠板层本身。有些厂商使用螺杆装置压塞，现代冻干机均采用液压马达活动式板层的箱内压塞装置。

箱内压塞对使用的瓶子和塞子有较高的要求，要求瓶子高度、瓶口内径、塞子外径的误差要小；塞子需采用透气性差的丁基橡胶，天然橡胶不宜采用。

此外，箱内压塞还需注意以下几点：

1）由于每一瓶子上边放有一个塞子，虽然还留有通气的缺口和小孔，但毕竟增加了水蒸气的阻力，因此冻干曲线需作相应的变更，加热需适当减慢，时间需适当增加。

2）由于压塞的总力量较大，为了不使冻干箱内的板层弯曲变形，每一层的产品必须放置均匀，不能偏在一方；如果因为产品少而放不满时，空着的部分必须用空瓶放上塞子后补齐。

3）压塞的力量不宜调得太大，当然也不能太小。对于活动板层的加压方式，由于每层是串联的，即一层压一层，因此总力与每一层的力是一样的，只要计算一层所需的力就是压塞总力，每一层的力也就是每一瓶所需的力乘上该层上放置的瓶数。

液压泵压力表的指示并非为压塞力，压塞力是液压泵压力表的指示值乘上该机液压活塞的截面积。

压塞装置也可用于产品的进箱和出箱，特别是大型的冻干机，这时活塞需安装在冻干箱的上方，此外压塞装置还利于冻干箱内清洗工作。

（二）清洗和消毒装置

如果冷冻干燥的产品中带有对人体有危害的物质时，冻干机应带有清洗装置，另外有些产品对人虽无害，但升华时随气流而飘到箱内各处，最好也带有清洗装置。

带清洗装置的冻干机在冻干箱内安装有许多喷嘴，有些是活动式的，当一台加压水泵工作时，喷嘴喷出的水流冲洗了箱内的所有表面，清洗后的水通过冻干箱的排出阀排出箱外。带有压塞装置的冻干机还可使板层上下活动，以充分清洗每一部分。清洗使用的水应符合制药要求。

医药产品要求无菌，因此要对冻干机进行消毒。过去使用的化学法不稳定，每批消毒后的效果不一定相同，而且消毒之后有残留物在冻干箱内，再次冻干时可能进入产

品，因此现代冻干机均使用高压蒸汽消毒法。

化学法消毒主要是使用乙醇、甲醛和环氧乙烷。使用乙醇时一般采用喷洗法；使用甲醛时采用熏蒸法。环氧乙烷的分子式为 C_2H_2O，也称为氧化乙烯，简称 ETO，它是一种有毒、易燃、易爆的气体。实际使用时要使用 12%的环氧乙烷与 88%的二氟二氯甲烷（R-12）组成的混合安全气体。这种混合气体不易燃易爆，但仍有毒性，需用钢瓶盛放。环氧乙烷对霉菌和酵母菌有较强的杀菌力，如果保持数小时，则能杀灭各种微生物，提高温度和湿度能增加环氧乙烷的灭菌能力，灭菌时宜加热到 60℃，相对湿度为 60%～80%。

为了适应环氧乙烷的消毒，冻干机安装有一台无油真空泵、指针式压力表、过滤器和减压阀。

环氧乙烷消毒冻干机的操作步骤如下：

1）在冻干机的板层上放几盘水，并加热板层到 60℃，以提高系统内的温度和湿度。

2）关闭冻干箱和汽凝器与外界相通的阀门，关闭真空系和汽凝器之间的阀门。

3）使用无油真空泵（ETO 泵）抽空冻干机系统，使压力表示真空表到 500～760mmHg（$1mmHg=1.33322\times10^2Pa$)，通过减压阀和过滤器放入环氧乙烷混合气体，使压力表示真空表到 430～460mmHg。注意此时压力低于大气压。

4）在上述压力保持 3～4h 之后，停止板层的加热，并继续保持 5～7h。然后使用 ETO 泵抽空到 500mmHg 以下，放入氮气或空气到 130mmHg，再抽空到 500mmHg 以下，如此重复 2～3 次，目的是排尽系统内的环氧乙烷。放入经消毒处理的大气，消毒结束。全部消毒时间约需 8～10h，注意排除环氧乙烷时，真空泵的排气不能直接排在房间内。

蒸汽消毒是目前最常用且最有效的消毒方法，消毒之后无任何有害的残留物，因此现代冻干机已开始装备蒸汽消毒装置。

使用蒸汽消毒的冻干机本身相当于一台高压消毒柜，冻干箱和水汽凝结器均使用蒸汽消毒，因此它们必须不仅能耐受负压，而且要耐受正压，二者均装有安全放气阀。为了在消毒之后能使系统迅速冷却，冻干箱和水汽凝结器均设计成双层夹套式结构，以便用冷却水进行冷却，大型冻干机的箱门也是双层夹套式结构。冻干机的箱门需适合耐正压的要求，因此普遍采用类似于高压消毒柜的辐射杆式锁紧装置，并装有安全设备，当冻干箱内处于正压和高温状态时，冻干箱门无法打开。

为了提高消毒效果和缩短消毒时间，消毒方式均为预真空式，因此冻干机带有一台水环式真空泵，除抽空系统之外，还用于消毒结束后抽除水分，作为系统的干燥之用。

为了适应蒸汽消毒的高温（最高达 138℃)，冻干箱板层内的传温流体需采用耐高温型流体。现在大都采用硅油，也有采用三氯乙烯的，但需用氮气加压以提高沸点。真空测量头也要求采用耐高温高压型的探头。

对于带有箱内压塞装置的冻干机，为了达到严格消毒的目的，在液压活塞杆上应加一个不锈钢的波纹管套管。

现代冻干机的蒸汽消毒可以预先编制程序，全自动地进行操作。手动操作步骤如下：

1）关闭冻干箱和水汽凝结器与外界相通的阀门，同时也关闭真空泵和水汽凝结器之间的阀门。

2）用水环式真空泵抽空系统，时间约 30min。

3）放入蒸汽进行升温，时间约 30min。

4）在规定的温度进行保温或保压，时间约 15～30min。

5）用水冷却，并用水环式真空泵进行干燥，时间约 60min。

（三）真空度调节装置

过去认为冻干升华时的真空度越高越好，也就是压强越低越好。现在则认为压强不是越低越好，而是要控制在一定的范围之内。压强太低时，冻干箱内传热较差，产品升华时得不到足够的热量，升华速度会下降。实验表明：在压强低于 0.1mbar（1bar＝10^5 Pa）时，对流传热很小，可以忽略不计；而在压强大于 0.1mbar 时，对流传热明显增加。因此，在同样的板层加热温度下，压强高时产品容易得到热量，升华速率比压强低时快。

当压强太高时，传热虽好，但由于气体密度增加阻碍了升华，升华速度又会减缓。因此认为冻干升华时的压强在 0.1～0.3mbar 比较适宜，有些产品在升华时压强可达到 0.7mbar 左右，在这个压强范围内既利于产品内水分的升华，又利于对流传热。

冻干机系统内的压强是由残余的空气分压强和系统内的水蒸气分压强组成的，因此压力的测量一定要使用能测量全压的真空计，如热导真空计或热偶真空计。

现代冻干机大都使用旋转真空泵和机械增压泵联合工作，使系统达到较高的真空度，这对于冻干的最后阶段降低产品内残余水分的含量是必要的，但在升华阶段和解吸阶段的初期，真空度太高会影响传热，为此冻干机增加了真空度调节装置。

真空度的调节常用有两种方法：一种称为校正漏孔法，也叫气体注入法。在冻干箱上安装好一个人为预先校正好的漏孔，把进入冻干箱的气体加以限制，使冻干箱的压强慢慢上升。这种方法是由微调真空漏气阀、电磁阀和真空仪表联合组成的。电磁阀由真空仪表的继电器控制，当它投入工作时，如果冻干箱的压强下降到低于真空仪表设定的下限值时，继电器工作，接通电磁阀，漏气阀向冻干箱注入干燥无菌的气体，冻干箱的压强逐步上升；当压强上升到高于真空仪表的上限设定值时，电磁阀切断，停止气体注入，冻干箱内的压强又下降，如此达到控制冻干箱内的压强在真空仪表设定的范围之间。

另一种是开关冻干箱和水汽凝结器之间的阀门法。当阀门关闭时，冻干箱产品中逸出来的水蒸气便没有通路，于是冻干箱内的压强升高；当打开阀门时，水蒸气又通向水汽凝结器，冻干箱的压强又下降。这种方法是由真空仪表与气动或电动真空阀门组成的。运转时，当冻干箱压强低于真空仪表下限设定值时，阀门关闭，冻干箱压强上升；当压强上升到真空仪表的上限设定值时，阀门打开，冻干箱压强下降，使真空度控制在仪表的设定范围之内。

真空度的调节还有真空泵间歇运转法和水汽凝结器的冷冻机间歇运转法。真空度的调节可用于升华阶段和解吸阶段的初期，一旦产品的水分升华完毕并达到产品的最高许

可温度之后，必须重新恢复高真空，以进一步降低产品内残余水分的含量，同时也为要进行的箱内压塞做好高真空的准备。

(四) 压力升高试验装置

目前尚无在冻干过程中连续测量产品内残余水分含量的仪器。一些带有自动取样装置的冻干机可在冻干过程中取出某瓶样品进行箱外检测，因此，冻干终点的确定仍是靠试验和经验。

一般这样确定结束冻干：在产品水分升华完毕，产品温度达到最高许可温度，并且系统恢复高真空之后（如果使用真空度调节装置的话），再保持 2～3h 以上，就可以结束冻干。

为了检查产品内的水分是否真正干完，在冻干结束之前，可以把冻干箱和水汽凝结器之间的阀门关闭 30～120s 观察冻干箱内压力的升高情况（冻干箱必须使用热真空计），如果压力明显上升，说明产品内还有水蒸气进出，尚需继续进行干燥；如果压力没有明显上升或上升很少，说明产品内仅有少量水蒸气逸出，产品可以结束冻干。

当进行“压力升高试验”时，冻干箱的漏气率一定要很小，并且事先知道漏气率的大小，不然会把冻干箱的漏气造成的压力上升误认为产品没有干完。

根据这一原理，一些冻干机带有压力升高试验的自动化装置，自动判定冻干的结束时间，这一装置工作时，在固定的间隔时间内会自动地关闭冻干箱和水汽凝结器之间的阀一段固定时间，然后自动测量压力的上升情况，与事先规定的一个压力数值进行比较；如果上升压力大于规定压力，则自动延长冻干时间，如果上升压力小于规定压力，则自动停止冻干机的运转而结束冻干。

使用前需预先设定上述的三个数据：

1）关阀的间隔时间，一般 15～30min。

2）阀门关闭时间，约 30～120s。

3）不应超过的压力数值（应视机器而定）。

压力升高试验用于确定冻干的终点时，仅在冻干的最后阶段才投入运行。

压力升高试验也可用于升华阶段，用于确定升华干燥是否完成以及用于产品温度的测量。但这时的关阀时间很短，只能几秒钟，不然压力将很快升高而引起真空报警，比较压力升高的数值可以知道升华阶段是否完毕。因为在 0.1mbar 时，1g 冰能升华成 10m^3 左右的水蒸气。当升华未结束时关阀后压力很快上升；当升华已结束时，关阀后压力上升较小。压力升高试验用于测量产品的温度是利用了冰的饱和蒸汽压与温度互相对应的关系，仅用于升华阶段结束之前，这时冻干箱内有升华出来的大量水蒸气；当关阀后，压力很快上升到饱和水蒸气压，根据这一压力就可查知相应的冰的温度，也就是冻干产品的温度（利用这种方法，冻干箱的漏气率应很小）。

三、冻干机举例与性能分析

(一) FTS 系列冷冻干燥机

FTS 是美国一家专门生产冷冻干燥设备的公司，其产品包括了十几项专利技术，

可自动确定产品的冻干曲线。其盘式冷凝器增加冷凝面积，使冷凝效率提高，最新的自动压盖技术使产品受到最好的保护。

FTS 预冻装置操作快速，通过使样品瓶在制冷剂中旋转，致使样品沿瓶内壁迅速铺展为一薄层的功能，并且适合各种尺寸大小的样品瓶。配合冻干机使用，使冻干效果大大提高。

FTS 台式冻干机适用于实验室及中等样品处理。大功率的制冷器提供高效、无限制的蒸发途径，大量快速冷冻干燥。可旋转或垂直调节的多管连接器，有 20 个可独立调节的真空阀，能连接各种不同体积的样品瓶。

（二）美国 Virtis 公司实验室冷冻干燥机 2K

Virtis 实验室冻干机结合产业型冻干机特点，具有温度低、真空度高的特点，并具有样品预冷、真空度控制及真空刹车装置，有各种配件供选择。温度有－55℃/ES、－75℃/XL、－85℃/EL 和－105℃/ZL 四种。

（三）韩国 BIOTRON 冷冻干燥机 Clean Vac 8

性能特点：大马力压缩机无氟制冷系统，冷阱的温度可达－85℃；可移式前门，便于制冷系统和真空泵维护；大容量制冷系统确保迅速制冷；通过真空压力表准确测量真空度；微处理器管理整个系统，所有参数在 LCD 显示器上显示；自检冻干终点：每小时停 1min 真空泵，检查这 1min 内的真空度变化，如果变化在设定值范围内，控制器在 LCD 显示器上自动显示冻干终点；可以选择加热隔板，提供升华时所需要的能量，提高冻干速度；LCD 显示真空压力、腔体和冷阱的温度及其他参数。

第三节　仪器操作

冷冻干燥的程序大致如下：在冻干前，把需要冻干的产品分装在合适的容器内，一般是玻璃瓶或安瓶，装置要均匀，蒸发表面尽量大而厚度尽量薄；然后放入与冻干箱尺寸相对应的金属盘内。装箱之前，先将冻干箱进行空箱降温，然后将产品放入冻干箱内进行预冻，抽真空之前要根据冷凝器冷冻机的降温速度提前使冷凝器工作，抽空时冷凝器应达到－40℃左右，待真空度达到一定的数值后（通常应达到 100μmHg 以上的真空度），即可对箱内产品进行加热。一般加热分两步进行，第一次加温不使产品的温度超过共熔点的温度；待产品内水分基本去除完全后进行第二步加温，这时可迅速使产品温度上升到规定的最高温度，在最高温度保持数小时后，即可结束冻干。

整个升华干燥的时间约为 12～24h 或更长的时间，这与产品在每瓶中的分装量、总装量、玻璃容器的形状、规格、产品的种类、冻干曲线及机器的性能等有关。

产品的组成直接决定该产品能否进行冷冻干燥。在产品的初加工过程中，很少使用冻干处理。产品的组成比对产品的冷冻干燥处理有直接和明显的影响，虽然产品加入的赋形剂需要经过反复试验，但是还是有更常用的赋形剂，其用途是提供等渗性和特定的 pH，主要有溴化钾、硝酸钠、氯化钙、氯化钾、氯化铵和氯化镁。有时还需加缓冲液

来控制产品的pH。起缓冲作用的赋型剂有磷酸钾、磷酸二氢钠、乙酸钠、柠檬酸钠、磷酸氢钠、乳酸和碳酸氢钠。总的来说，蛋白质比糖的冷凝点低；脂肪是不可以进行冷冻干燥的，低气压物质也不可以进行冷冻干燥，如甘油；如果使用甘露醇作为膨胀剂，含量不能超过5%，因为它会导致冷冻管破裂。

一、预　处　理

预处理过程包括：样品浓缩、调整组分、减少高气压溶剂和增加表面积。每一预处理过程依赖于冻干理论和对样品的具体要求。

（一）样品浓缩

常用于食品加工处理中。如果对果汁进行冷冻干燥处理，先需使果汁中的果肉进行沉淀，由于冻干过程是一个代价比较高的处理过程，因此需要预先将果汁中的上清液去掉。

（二）过滤

过滤处理具有二重性，一方面它可以减少溶剂的含量，另一方面，溶剂含量减少使得物理性质近似的分子在冷冻干燥前容易引起反应。

（三）避免产品破裂

许多情况下，产品一经干燥处理完就投入市场，这时，产品的物理性质就显得特别重要。如果产品中固体成分少，在冻干瓶底部就会有少量产品沉淀，由于少量固体产品可能无法形成较好的饼状结构，导致产品飘散。为了形成很好的漂亮的饼状结构，常使用膨胀剂，这类物质不改变产品的生物和化学性质。

（四）限制化学活性

在冷冻干燥处理之前，许多产品在同一干燥容器中，是化学性质非常复杂的混合物。为了抑制化学反应，产品分子必须保持一定的距离，通常是通过加入膨胀剂或水来实现。

（五）防冻剂

在冷冻生物样品时往往需要加入防冻剂，常用的有DMSO和葡聚糖。防冻剂的工作机制还不是很清楚，有些假说认为其在冷冻过程中促进了水分的交换。

（六）过干保护

多数情况下不会出现过干问题。如果过干会引起不良结果，可以加入蔗糖或吸湿性化学物质。病毒和细菌培养物进行冷冻干燥时，过干会导致其失去活性，如果水分含量低于1%，就会出现过干问题。

（七）增加表面剂

冻干过程中，产品的表面积应该尽可能大，例如，在化学分析前需对人的肝脏组织

进行冷冻干燥，在冻干前，先将肝脏捣碎成浆状，然后分放在盘中，这样可以增加冻干质量且缩短冻干时间。如果使用多管连接器可以有效增加冷冻品的表面积。

（八）减少高气压溶剂

许多产品的处理使用高气压溶剂，这些溶剂的凝固点低，导致在常规冷冻干燥条件下无法冻干。当高气压溶剂放人冻干机时，挥发速率较快。假如加入过多这类溶剂，在高压下产品有可能溶化，因此在冻干前应尽可能将它们除去，最常用的办法是使用旋转蒸发仪。许多情况下，因为产品在高温下化学性质很活泼，所以需要在低温下保存，需要外加一个低真空泵。

二、冷冻过程

第二步就是冷冻样品，这一步极为关键，但很难彻底理解，必须明确冷冻产品可以通过减少分子的运动来降低其化学活性，同时也是脱水的关键步骤，一旦溶剂变为干燥状态，那么溶液也就变成干燥状态。

为了进行恰当的冷冻干燥，需要进行产品的热分析。水的冷凝点是 0℃，有些产品含有水以外的成分，不但在 0℃且在低于 0℃时，产生溶解热和结晶热。有些产品不形成真正的结晶而是形成玻璃态和无定形态。许多产品以分子水平的视觉难辨凝固点的温度溶化，所以通过热分析进行冷冻干燥比较方便。

在产品基质中存在有自由水，在冷冻过程中会形成纯化冰晶，在冰晶中存在有间隙区域，当这些区域的分子运动达到零时，间隙区域往往认为已经冷凝。这也许是由于间隙区域形成了共晶体或由于有限的分子运动导致的无定型态的形成的缘故。因此为了更好的冷冻产品，在初级干燥过程中，产品温度应保持在融化温度或共晶体温度之下。

基于以上原因对产品进行热分析是非常重要的。常用的方法是绘制温度时间曲线，用热耦进行溶解热的测量依赖于产品的浓度，低浓度产品的溶解热不容易用热耦进行测量，因为热量有可能被剩余的溶剂或容器所吸收。况且不是所有的产品都形成晶体产生溶解热，有些产品只形成不定型态，虽然使用温度时间曲线进行热分析有很多困难，但是对于大多数实验室来说，这却是唯一可行的办法。在热分析过程中必须克服过冷效应（低于冷凝点不结冰），这样才容易进行溶解热分析。在热分析过程中，可以利用电阻率探针，将两个探针放在产品间会有微弱的电流产生，当达到冷凝温度时会发现电阻率会有明显的增加，用于电阻率测量的探针必须尽可能使热量和热通道小，而且有时需要在产品表面形成皮层结构有利于作为测量电阻率的主体。

热分析时还可能使用差式扫描热量计和差式热量分析仪，有利于确认产品的融化温度、共晶体温度和相变温度。

低温显微镜也用于研究产品的冷冻现象，尽管每一个热分析方法都有自己的缺点，但是许多热分析方法都非常必要，必须认识到分析的局限性，一般情况下使用低于共熔点 5℃的温度。

一旦确定了产品的冷凝点，也就确定了冷冻速率，冷冻速率将有助于确定晶体的大

小，由于溶剂晶体最终从产品中挥发出来，较大的晶体结构将产生一个孔，然后渐渐成为干品。一个重要的原则是：冷冻速率快，化学活性降低快，晶体结构小，冻干时间长。在液氮中冷冻的产品，或其他低温的气/液体，相对冷冻速率快一些。某些产品的速率快甚至可以产生无定形或玻璃态物质或者晶体，只有加热才可以避免这种情况。但是如果产品化学性质很活泼，就需要较快的冷冻速率。冷冻速率慢会产生较大的晶体结构，这对于冷冻干燥的循环是有利的，但却会导致上述的一些麻烦。放置产品时，产品体积一般不超过容器体积的1/2。

对一个产品如何进行冻干，取决于冷冻容器和冻干机的类型，如果将多管连接器接在大容量的冻干箱上进行冷冻干燥，产品需进行预冷冻，通过旋转预冻瓶，增加冷冻表面积。如果在盘式冻干机中用较小的容器冻干多数量样品，需要进行静态和排插冻干。血清瓶、小瓶和安瓶在垂直位置上加适当的高度，这种形式的冻干样品添加量需要25ml。一个不正确的冷冻程序会导致物理特性或活性低于所需要求。

三、初级干燥

对于任何一个冻干机，有三个主要组成：产品添加部分、压缩机和真空泵。每一部分对冻干机的功能都非常重要。有两种类型的产品添加部分，分别为多管连接器和盘形。如果产品相对难处理，化学性质复杂，容易腐蚀，应该使用盘式冻干机。使用盘式冻干机过程中，研究人员应该对冻干参数进行严格的控制。如果产品的属性相对简单，容易冷冻干燥且量少，产品仅在室内使用，则可考虑选用多管连接器。

如果使用多歧管进行冷冻干燥，可以使用一个－40℃和低于67Pa的预冻装置。将产品放入多管连接器，并将冻干容器连接到多歧管的阀上，然后打开阀将产品暴露到冻干机系统中。使用多歧管时，在产品和低温压缩机之间的气体通道必须尽可能保持畅通无阻。由于研究人员无法对多歧管冻干机的驱动力进行完全控制，所以冻干产品的质量在某种程度上而言取决于运气。如果产品无法在多管连接器冻干机中进行干燥，并不意味着该产品无法进行冷冻干燥，也许是产品需要对温度（能量输入）和压力进行更好的控制。

冷冻干燥技术给人和动物医用的温度敏感性产品提供了一种良好的保存技术。冷冻干燥技术早已成为一项应用范围极其广泛的技术。冷冻干燥技术最为典型的用途是：质粒、血清、维生素制备、激素、酶、无活性的和有活性的细菌、病毒疫苗等的保护。

第四节　应用举例

冷冻干燥的基本方法是通过在减压条件下使冻结的细胞悬液中的水分升华，使培养物干燥。此法是微生物菌种长期保藏的最为有效的方法之一。冷冻干燥过程中必须使用冷冻保护剂，目前国内常用脱脂乳和蔗糖，如脱脂牛奶、脱脂牛奶-蔗糖-谷氨酸钠等，国外也有运用动物血清或者由血清和葡萄糖等制成的干燥合剂等。大部分微生物菌种可

以在冻干状态下保藏10年之久而不丧失活力，而且经冻干后的菌株无需进行冷冻保藏，便于运输。以菌种冷冻干燥保藏为例说明冷冻干燥的操作与设备。

一、实验材料

1）冷冻干燥器；

2）可调控温装置（－40～－10℃）；

3）带有泡沫塑料内衬冷冻槽（2只）；

4）－50～50℃温度计（2支）；

5）用脱脂棉轻轻塞好，并经高压灭菌的硼桂酸溶液；

6）20%脱脂乳，高压灭菌；

7）1ml吸管；

8）待保藏的菌株培养物。

二、操作步骤

1）启动冷冻干燥器的制冷单元，当冷凝器的温度低于一定温度时，启动真空泵，使真空度达到2.67～4.00Pa。

2）将冷冻槽置于歧管下方，槽中装入2/3体积的异丙醇，然后插入温度计及可调温控仪降温探头，打开降温探头控制醇浴温度在－40℃，这一过程约需30min。

3）每支斜面加入2ml 20%的脱脂乳，然后用巴氏吸管将斜面上的菌苔吹打下制成孢子或菌悬液，最终菌体浓度一般要求在10^6 CFU/ml（CFU/ml指每毫升样品中含有的细菌群落总数）。用细菌浸没培养物来保藏时，加入40%的脱脂乳，混合制成含10^6 CFU/ml的菌悬液。

4）取下安瓶上的棉塞，然后用1ml移液管分装至安瓶（0.2ml/瓶），重新塞好棉塞。

5）轻轻振荡安瓶，以使细胞重新悬浮。将安瓶与歧管相连后迅速置于醇浴中，使细胞悬液迅速冻结。

6）15min后，将歧管与真空泵相通。

7）维持－40℃醇浴温度90～120min，然后调节温控装置，使醇浴温度上升至－10℃，维持2h。

8）关掉温控装置的降温探头，醇浴温度上升至室温（25℃）。

9）在冷冻干燥的最初4h内应定期测真空度，在安瓶置于真空下后1h内，真空度必须达到13.33Pa，并于菌悬液接近干燥时逐渐降到2.67～4.00Pa。

10）在真空状态下，让安瓶保存在冷冻干燥机中至少16h，以获得完全干燥。

11）干燥后，在2.67～4.00Pa的真空度下封瓶。

12）在所有安瓶都封盖好后，撤去真空。

13）关闭真空泵。

14）关闭冷凝器。

如无冷冻干燥器，则应在－40℃冰柜中或化学制冷单元中进行。

三、冻干菌种的保藏与复苏

1. 保藏

保藏冷冻干燥后的培养物应低于5℃。一般认为较低的保藏温度(－20℃至－70℃)对于培养物的长期稳定更好。

2. 复苏

1) 在超净工作台中用70%乙醇棉球擦洗安瓶，然后用砂轮在安瓶中锉一道沟。

2) 用无菌纱布垫或无菌毛巾包好安瓶，然后用手掰开安瓶。

3) 在安瓶种加入0.5～1ml营养液体培养基，慢慢旋转安瓶，使冻干菌种复苏。然后将菌种转接到含有再生培养基的无菌试管中，或直接接种琼脂斜面或涂布平板。

4) 在试管中冻干的菌种通常为絮粉状，可以将此直接振落入盛有1～2ml液体培养基的试管中，轻轻振荡5～10min，然后用此悬液接种适宜的再生培养基。

主要参考文献

王立业，谢国山．2003．真空冷冻干燥机的开发现状与发展趋势．化工装备技术．24 (6)：9～10
闵剑青．2001．压缩空气冷冻干燥机的参数设计．机电工程．18 (2)：44～45
罗吉有．1995．FD-1型冷冻干燥机．真空与低温．1 (4)：212
王孝敏．2001．ALPHA1/6型真空冷冻干燥机的故障分析．现代仪器．(2)：36
童建民，邓辅仁，丑乔力．2000．ZDG40真空冷冻干燥机电加热系统．6 (1)：57

第十七章　超净工作台

超净工作台也称净化工作台，是实验室不可缺少的用于无菌操作的空气净化装置，可用于生物化学实验室中药品、微生物制剂、组织细胞等的无菌操作，在生物工程、制药、植物组织培养等方面应用广泛。同时，分子生物学实验中细菌的增殖、质粒纯化等工作也都需要在超净工作台中进行。

第一节　基本原理与基本概念

超净工作台按其工作性能分为两大类：一类为正压型超净工作台，可分为紊流型与层流型两种，主要起保护产品作用，仅限于无菌、无毒的标本操作。工作原理是空气经过高效过滤器后，干净的气体吹向工作台面，只对产品起保护作用。其不足之处在于不能确定吹向净化工作台以外的风是否有菌，是否对周围环境产生气溶胶，是否对人员和周围环境造成污染，因此，目前已成为国外市场的淘汰产品。但因该类产品价格低廉，使用寿命长，在国内仍然有较大的市场。

另一类生物安全超净工作台，又称为生物安全柜，主要是对人体进行保护。其中又分为三级，一级是台外空气不经过高效过滤器直接进入台内，具有一个供操作的前开口和一个排风高效滤器，气流从操作人员处来，经前开口进入台内，然后经过排风高效净化后排出台外，所以进入台内的是未经过滤的室内空气，可能对产品产生污染，而排出的气体则是洁净的，由于气体是具有一定速度的单向流，台内操作时产生的气溶胶不会溢出台外，故对台外工作人员有保护作用。该类净化工作台只适用于对检测样品不高的一类操作。二级为层流式，这种方式的操作台对工作人员及实验品都进行了保护，其原理是使空气通过高效滤器吹向台面，经过产品，然后再经初、中、高效滤器将其中的一部分排到室内，而大部分回到原系统继续使用。由于吹向产品或实验品的空气及排到室内的空气都是经高效滤器的高洁净度的空气，因而对人及产品都起到了保护作用；同时，由于这种空气流动方式在台内外之间形成了高速气幕，把台内和台外开口处的空气阻隔开来，因此这种生物安全净化工作台使用广泛，最适合对有病原菌的低、中度危险的标本进行操作。二级生物安全净化工作台按其保护能力又分为 A 型和 B 型。B 型超净台的特点是强调把气体排到室外，因此可用于化学致癌剂的操作，按其结构又可分为单面和双面操作型。三级与二级的主要区别是台前密封连接于壁的手套伸到台内进行，因而台内始终是负压，故安全度更高。按其绝缘部分可分为手、半身、全身隔离式生物安全超净工作台。

第二节　结构与性能特点

一、基 本 结 构

超净工作台比生物安全柜结构简单，由操作区、风机室、空气过滤器、照明设施和配

电系统等组成，可制成单人工作台、双人工作台和多人工作台等形式。该设备可根据工作需要采取灵活的排风方式，例如，针对某些工作过程中产生的有毒气体、尘埃，采用台面后部排风至室外或台面上全面排风至室外的处理方式，以保护工作人员作业区的卫生条件。生物安全柜的风向流动和基本结构见图 17-1，超净工作台的基本结构见图 17-2。

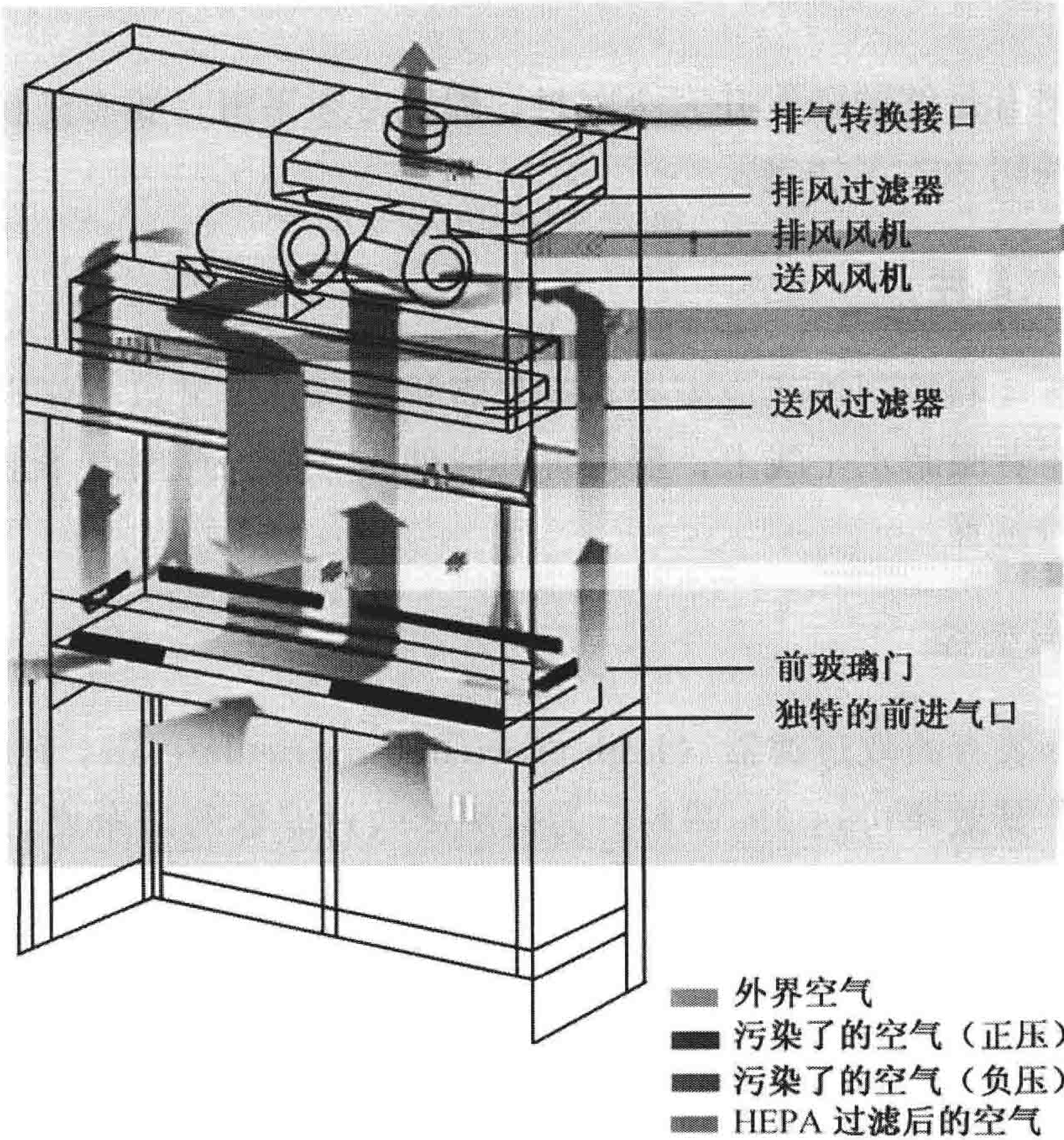


图 17-1　生物安全柜的风向流程图

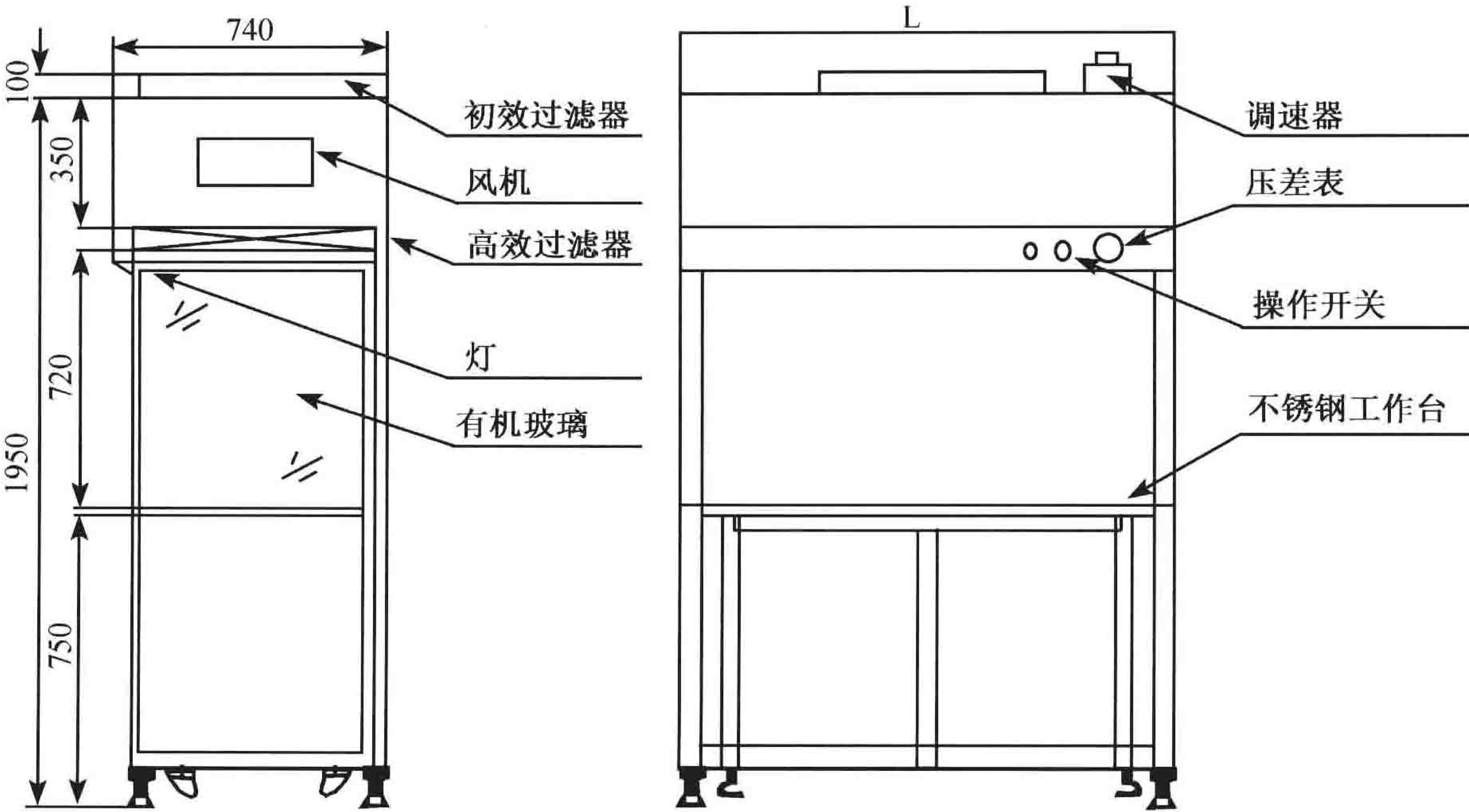


图 17-2　单边操作垂直流洁净工作台结构图
（来自 http：//www. zyinstrument. com）

二、设计要求

超净工作台的基本设计要求如下。

1. 柜体材料

柜体材料必须有足够的强度并完全密封，焊缝必须平滑，要有防锈和防消毒剂侵蚀的能力，一般都选用304不锈钢。

2. 操作面板与电气部件

所有的电气连接和控制单元应安装在操作者视力可及区域以方便操作，因此操作面板一般设置在操作者眼睛水平线上，要可拆卸以便于维修。照明灯不能设在直接照射或反射操作者眼睛的位置。

3. 高效过滤器及其监控

超净工作台都装有高效过滤器（high efficiency particulate air，HEPA），用于除去0.3μm以上微粒，其效率可达99.99%。为检测高效过滤器的洁净度，操作面板要装有指示其阻力的压差表。此外在高效过滤器上方要设采样口，以便于验证高效过滤器的实际性能。

三、超净工作台的性能指标验证

根据我国卫生部的药品生产质量管理规范（GMP）规定，设备应定期进行维修、保养和验证，验证的主要目的是为了确认安装的设备是否符合采购合同中的技术规格；对于超净工作台，定期的检测主要集中在超净工作台的气体流向、高效过滤器的完整性、工作面的空气流速和照度等因素上。一般来说，需测试的这些指标都应有相应的合同标注技术指示或国家标准；超净工作台的悬浮粒子数和沉降菌数也具有相应的国家标准。仪器验证主要分安装确认、运行确认和性能确认三部分进行。

1. 安装确认

超净工作台由底座支架、柜体、辅助设施三个单元连接而成。安装确认主要检查安装情况及与公用介质的连接。

2. 运行确认

完成安装确认后，需对设备进行运行确认，运行确认主要包括：

1）用烟雾法测试气体流向：在柜内各点喷放烟雾，柜内烟雾应水平由里向外形成层流。

2）用DOP法检测高效过滤器：在高效过滤器上端喷放DOP烟雾，在其下方约

2cm 处用检测仪扫描测试，巡检速度约在 5cm/s 以下。仪器读数不得超过 0.03%。

3）检测气流速度分布：在离过滤器表面 6in（1in＝2.54cm）处，自左上角起以 12in×12in 的方格布点，测量每点的风速。平均风速应在 0.41～0.51m/s。

4）检测工作面的照度：平均照度应不小于 300lx。

3. 性能确认

在完成运行确认后，需对设备进行性能确认。性能确认包括：

1）悬浮粒子检测：将粒子计数器放在工作面上均匀取 5 点检测，每个检测点记录三次。测试标准：每立方英尺中直径大于 0.5μm 的粒子数少于 100 个；每立方英尺中直径大于 5μm 的粒子数为 0 个。

2）沉降菌数检测：按卫生部颁发的中国生物制品规程（2000 年版）配制普通肉汤琼脂培养基，在工作面上均匀取 5 点采样，每个采样点设置三个培养皿。将培养皿按要求放置后，打开平皿盖，使培养基表面暴露 30min 后，将平皿盖盖上。在 35℃条件下培养 48h 以上计数。合格标准：菌落数/皿≤1 为合格。另取三个阴性对照，均不许长菌。

通过以上验证，超净工作台对研究与生产的局部净化功能将得到最佳运用。

四、不同型号超净工作台性能特点

（一）美国 NUAIRE 公司超净工作台系列

目前美国 NUAIRE 公司生产的超净工作台已在美国大部分生物实验室内使用。NUARE 超净工作台系列有如下特点：该超净工作台克服了侧流式、外流式超净工作台气体流动的缺点，使气流循环更为科学；高效微粒过滤器 HEPA 保证零泄漏；100%不锈钢密封结构，保证了空气浊度的最小化；独有的工作环境改造学设计；低振动，操作安全。

（二）意大利 Bioair 公司 AURA MINI 垂直超净工作台

AURA MINI 的独特设计可安全地进行无菌产品处理，内部的气障增加了操作者的安全性，而外部则设有障碍模式和 PCR 版的激活模式。此仪器是部分再循环的层流柜，当空气以 0.45m/s 的速度通过工作区时，HEPA 过滤器可过滤掉 99.999%的 0.3μm 的颗粒，确保整个工作区达到 100 级。

该设备包括内部气障和外部气障两个设置。内部气障：气障被吸进前部的通道和鼓风机吹进的向下流动的空气一起参加再循环。其中的 70%通过 HEPA 主过滤器返回到工作区，30%通过 Filtrete 空气滤器（可过滤掉 99%的 3μm 的颗粒）被排到环境中，这样的设置可更好的保护产品。外部气障：空气被吸进 Filtrete 空气滤器，与经过再循环的空气混合，通过 HEPA 主过滤器返回到工作区，30%的空气通过前部通道被排出，70%参加再循环。这种设置可最好的保护产品。

AURA 垂直超净工作台主要应用于：介质制品、植物和动物组织培养、药学制品、

光学或微电子元件的组装和微观力学领域等。

第三节 操作使用

一、使用说明

每一型号的超净工作台其操作方法都不完全相同，但有一些常规的公用步骤如下：

1）使用前，擦净超净区内各部位尘埃（灯管、灯架、台面等），然后开启紫外灯，杀菌20～30min后关闭紫外线灯、开启风机即可操作。

2）上下提拉有机玻璃屏罩时，一定要缓慢操作，如果发现卡住，要查找原因及时处理。

3）操作完后应将玻璃门放下。

二、常规要求

1）安装时，为不破坏柜内气流及风速，柜体开口处不得有强气流。柜体四周应留有不小于305mm的间距，柜顶与天花板间距不小于15mm，以便于维修保养和清洁。

2）柜体后、侧面板上可根据工作需要加装煤气、压缩空气或氮气等供应管道或电源插座，这些辅助设施须与柜体密封、无间隙。

3）检查柜内排风以确认风口未被堵塞。

4）柜内工作区不锈钢表面用75%乙醇或无腐蚀作用的杀菌剂擦拭消毒，切记不要使用任何氯化物或卤素材料。

5）尽可能减少其他人员在柜前的活动，防止影响层流的风速和平衡。

6）工作完成后需进行清场，静置2～3min，使空气充分净化。

三、特殊要求

1）在开始实验前，至少让风机运行5min。

2）超净工作台没有对操作人员的保护，因此不能进行致病菌和可能对人体造成危害的微生物制剂的操作。操作者必须牢记气流走向，以防不安全因素。

四、维护保养

1）不管哪一类超净工作台，都应建立登记本，定期对超净工作台进行检测，定期进行细菌培养，发现问题及时解决，这样才能有效地防止感染。

2）经常使用的超净工作台，应经常更换过滤芯，过滤芯阻塞后将达不到过滤的目的。一般每天都使用的超净工作台，一年更换一次过滤芯；一周使用一次的工作台，5年更换一次过滤芯。

3）在更换过滤芯的同时，应对滤管、滤网进行彻底清洗，具有高效过滤器的净化工作台应按说明要求定期更换过滤膜。如果是液体的高效过滤器，应及时补充消毒剂，以确保最佳过滤效果。

主要参考文献

李洪敏，石国剑，于玺华等．2000．正确使用净化工作台．现代科学仪器，(4)：51～52

梁静频，程惠蓉，李亦德等．2001．生物安全柜与超净工作台的设计要求、验证及应用．中国微生态学杂志，13 (3)：156～157

第五篇　基因扩增和转移设备

基因扩增是 DNA 重组技术的基础。DNA 重组技术的第一步就是获得目的基因，并将其进行扩增，保证有足量的遗传物质转移到受体细胞中。这一过程中主要使用的仪器有 PCR 仪。基因转移是指将来自供体的遗传物质（如 DNA 分子）转移至受体细胞的过程。人类在体外对遗传物质进行改造后，为了探明这些经体外操作改造的 DNA 分子在体内的结构功能变化，就需将它们送回到动物、植物或细菌细胞内，因而需要建立快速、高效的基因转移技术，其中部分是通过成套的仪器来完成基因转移的，如细胞融合仪、电穿孔仪和基因枪等。本篇将详细介绍在基因操作过程中的常规基因扩增设备 PCR 仪和基因转移设备细胞电融合仪和基因枪。

第十八章　基　因　枪

人类早就梦想能够突破物种界限，按照人的意愿培育或改良动植物新品种。20 世纪 70 年代，DNA 重组技术的出现为人类愿望的实现提供了可能。在获得符合要求的基因之后，面临的是如何将基因导入所选择的细胞中，并使之稳定表达，出现所期望的遗传性状。其中，基因导入是关键的环节之一。随着动植物基因工程研究的相继开展，先后出现了化学介导、生物介导和物理介导等类型方法。在物理介导法中，有激光打孔、电击孔和基因枪等方法。

基因枪法，又称生物弹法或微粒枪法、微粒轰击法，是依赖高速度的金属颗粒将外源基因引入活体细胞的一种转化技术。它是继农杆菌介导转化法之后又一应用广泛的遗传转化技术。这种方法操作简单，效率高，适应性强。一次可以向数以千计的细胞导入基因，不受细胞、组织或器官的类型限制，此外其目标命中率高，因此格外受重视。基因枪根据其加速装置可分为火药式、电动式和气动式。

第一节　基本原理及影响因素

一、基 本 原 理

经适当处理后，使 DNA 液均匀地吸附在或包裹于微小的钨粉或金粉颗粒表面，利用基因枪的火药爆炸、高压放电或高压气体作驱动力，发射出微弹与 DNA 的复合体，击中并高速穿透真空室中受体细胞的细胞壁及细胞膜，进入细胞内，从而达到将吸附于微弹上的外源 DNA 导入细胞或原生质体，获得整合与表达的目的。微弹复合体对受体细胞造成的损伤可以修复。

二、影 响 因 素

1）不同浓度的 $CaCl_2$ 对基因瞬时表达和稳定表达的影响。

2）添加亚精胺溶液与未加亚精胺的轰击对基因瞬间表达影响不大。

3）太高的氦气压力会对细胞造成不可逆的损伤。

4）轰击次数对愈伤组织转化的影响很小。

5）细胞处于不同的生理状态，初生愈伤组织细胞的结构紧密，细胞核大，质浓，而继代 3 个月后的愈伤组织逐渐老化，细胞液泡化程度高。

6）在基因枪转化前 24h 分别用 5、10、20Gy γ 射线辐照处理愈伤组织。5Gy 处理的基因瞬时表达明显增强，抗性愈伤比例比对照提高近 1 倍。

第二节　实验仪器

一、组成结构

1）火药引爆型基因枪的主体是由滑膛枪、真空轰击室和阻弹部件构成的。塑料子弹的前端载有大量携带了外源目的基因的微弹，当火药爆炸时，子弹带着微弹向下高速运动，至挡板时，子弹被阻碍，其前端的微弹依靠惯性继续高速运动，击中轰击室中的靶细胞。此枪的特点是其粒子浓度主要是通过火药的数量及速度调节器控制的，不能无级调速，可控度低。

2）压缩气体型基因枪的动力系统是以氦气、氮气或二氧化碳等来驱动的。一种方法是把载有外源目的基因的微弹悬滴在一张金属筛网上，在高压气体的冲击下，射入受体靶细胞。另一种方法是外源目的基因不需事先沉淀在微弹上，而是使两者混合后雾化，再由高压气体驱动射入受体靶细胞，这种系统的靶范围可精确控制到0.15mm左右。

3）高压放电型基因枪是利用电加速器，通过高压放电将微弹射入受体靶细胞，其特点是可无级调速，通过调节放电电压来控制粒子速度和入射深度。

二、不同型号基因枪的性能特点

（一）宁波新芝生物科技股份有限公司手提式基因枪SJ-500

该型号基因枪主要用于体内细胞生长和发育机制的研究，特别是基因治疗和基因免疫（基因疫苗）的应用。这种微型基因枪不携带病毒和毒性化合物并适度转运基因物质进入不同细胞或器官，压力范围为0.5～5MPa；最大靶面积为2cm^2；最大靶直径为16mm。

（二）宁波新芝生物科技股份有限公司高压气体基因枪GJ1000

该基因枪在广泛的细胞型中起到瞬时的、稳定的和高效率的转化作用。适用于微生物、植物、动物的转基因。

第三节　基因枪的使用操作

一、使用方法

1. 材料准备

在9cm^2培养皿上铺一薄层培养基，把材料（一般用未成熟胚、成熟胚、小愈伤组织、悬浮细胞、原生质体等）平铺于培养皿中心，直径在3cm范围内。

2. 金粉的处理

取60mg金粉或钨粉置于离心管中，加入1ml无水乙醇，充分振荡3min，以9615*g*

离心 1min，去上清，再加入 1ml 无菌水充分混匀后，以 9615 g 离心，重复上述步骤 3 次。最后，将金粉悬浮于 1ml 无菌蒸馏水中，置 4℃或室温下储存。

3. DNA 的处理

取 50μl 金粉悬浮液，依次加入 5μl 的质粒 DNA（1.0μg/μl）溶液、50μl 0.1mol/L 亚精胺（所用的溶液经无菌消毒），振荡 3min 后，在室温下放置 10min，以 9615 g 离心 10s，弃去上清液；加入 250μl 无水乙醇，振荡后以 9615 g 离心 10s，弃上清液。沉淀重新悬浮于 60μl 无水乙醇中，可供 5 枪（每枪 10μl）使用。

4. 基因枪的操作

基因枪的所有操作均在无菌条件下进行，具体步骤如下：

1）先用 70%乙醇对基因枪表面及样品室进行消毒。同时，用 70%乙醇将阻挡网和可裂圆片，微弹载体及其固定器、固定工具浸泡 15min 后，放在超净台上晾干。可裂膜片、固定盖、微弹载体发射装置可用 70%乙醇进行表面灭菌，吹干。

2）将微粒载片嵌入固定环中，取 DNA 及金粉的混合物加于微粒载片中心，干燥 1min 左右。

3）安装可裂膜于其托座上，顺时针拧到气体加速器上。

4）将空间环、阻挡网、阻挡网托座、微粒载片及固定环（带有微粒的一面朝下）安装好，旋紧盖子，插入抢中。

5）把样品放在轰击室中，关好门。

6）打开氦气瓶的总阀，顺时针转氦气调节阀，使氦压表指针的示数高于可裂膜压力 200Psi（=1.379MPa）。

7）打开基因枪及变压器开关。

8）按动真空键，待真空度至 26～28in Hg（=88.05～94.82kPa）时，迅速按下 Hold 键，接着按住发射键，并保持不动，直到激发为止。

9）按通气键待真空表归零后，取出样品。

10）关机。

把氦气瓶的总开关旋紧，打一次空枪，把氦压表指针归零后，再逆时针旋转氦压表调节阀；关闭基因枪的总开关及变压器开关。

二、注意事项

1）质粒 DNA 的储存浓度在枪击前最好调至 1μg/μl，这样有利于制备微粒子弹时的 DNA 取样。质粒 DNA 与金粉形成复合体的比例以 0.75～1μg/mg（金粉）为宜。

2）质粒 DNA 的纯度和浓度是影响转化率的重要参数之一。一般每枪用 0.75～1μg DNA。

3）亚精胺最好是现用现配，或者储存于－20℃冰箱中（时间不超过 1 个月）。如没有保存好或保存时间过长，亚精胺会发生降解，从而影响 DNA 吸附于金属微粒表面的能力。

4）对于植物材料转化，微粒子弹载体的选择视受体材料而定。此外，可裂圆片的规格应与微粒子弹载体对应。

第四节　基因枪在生物学及医学方面的应用

一、基因枪在肿瘤基因治疗研究中的应用

基因枪在肿瘤基因治疗的研究主要在间接体外和体内两个领域。间接体外领域主要是瘤苗的研究，即在间接体外对肿瘤细胞转基因，经过照射使之失去增殖能力后，再回植到体内，以达到提高机体抗肿瘤免疫的能力。由于患者肿瘤手术切除标本非常难于在体外长期培养，而且即使获得长期培养物，肿瘤细胞表面存在的一些抗原性物质也可能已经发生了改变。所以，基因枪这种不需要长期体外培养的转基因手段在这些研究中具有很大的优势。

二、基因枪在植物基因转化中的应用

目前，农作物基因工程正进入一个飞速发展的时期，越来越多的转基因植物和产品进入市场。不但可以利用基因枪技术种植具有特定农艺性状（如抗病、抗旱、抗寒、抗涝、抗虫、耐盐、耐药等）以及高质量食品（高蛋白、高油酸、含维生素等）的作物，而且也可以利用该技术来开发和利用具有特定用途（如生物制药）的植物。总之，有了这种高效的转化技术，作物复杂的生理生化性状等可望得到进一步的改良。

主要参考文献

郭春沅．2000．基因枪——导入外源基因的新式武器．现代物理知识，(3)：38
胡张华，刘智宏，郎春秀等．1999．影响大豆基因枪转化的几个参数．浙江农业学报，(5)：242～244
徐淑平，卫志明．1998．基因枪的使用方法介绍．植物生理学通讯，34 (1)：41～43

第十九章 PCR 仪

通常，DNA 扩增法是分子克隆法，人们要从生物材料中得到某一特定的 DNA 序列或进行其序列分析、鉴定，需要按传统方法进行酶切、连接等步骤构建含有目的基因的载体，然后导入受体细胞进行扩增，再经过同位素标记探针进行筛选。虽然 DNA 扩增法在技术上已无难点，但它操作复杂，一般需要数周到数月的时间。聚合酶链反应，即 PCR（polymerase chain reaction），又称无细胞分子克隆法，是近年来发展起来的一种快速可靠的体外扩增特定 DNA 片段的新方法，是分子生物学的重大技术突破之一。PCR 技术在一种耐热聚合酶的催化作用下，经过热循环反应，可在数小时内对仅有几个拷贝的基因放大百万倍，大大简化了传统的分子克隆技术，从而简便地对目的基因进行分析、鉴定。

PCR 技术是 20 世纪 80 年代后期迅速发展起来的。1983 年 Mallis 发明聚合酶链式反应；1986 年 Erlich 分离并纯化了适用于 PCR 的 *Taq* 耐热聚合酶；1988 年 Saili 开始使用 *Taq* 酶进行 PCR 扩增，使 PCR 实用化。从此，PCR 技术迅速地进入生命科学、医学工程、疾病诊断、遗传工程、法医学和考古学等各个领域，并显示出极大的实用价值。1989 年美国 *Science* 杂志由 Guyer 著文称 1989 年为“分子年”，将 PCR 列为十余项重大科学发明之首。1993 年 PCR 的发明者 Mallis 荣获诺贝尔生物学奖。我国于 1988 年在复旦大学开始进行耐热 *Taq* 多聚酶研究，研制出适合 PCR 用的 FD 多聚酶。随着 PCR 技术的推广，各种 PCR 技术实验设备也不断地研制出来，基因扩增是这类设备的核心，其发展尤其受到重视。国际上，美国 PE 公司于 1988 年推出世界上首台商品化的 PCR 热循环仪。1990 年初，国内研制成功我国第一台独具特色的微电脑自动基因扩增仪。近来，国内外十几种不同型号的 PCR 仪进入市场，为 PCR 技术的推广提供了保证。

第一节 PCR 的基本概念与基本原理

一、基本概念

（一）DNA 的组成和结构

自然界中的 DNA 是以双螺旋结构形式存在的。其基本结构单位是脱氧核糖核苷酸。脱氧核苷酸由碱基、磷酸和脱氧核糖组成。其中碱基有四种：腺嘌呤（A）、鸟嘌呤（G）、胞嘧啶（C）和胸腺嘧啶（T）。两条互补的多聚脱氧核苷酸单链，在氢键的作用下配对，形成双螺旋结构的双链。碱基的配对是固定的，即 A-T 相配，G-C 相配。A 和 T 间形成两个氢键，G 和 C 间形成三个氢键，这种氢键连接是相当稳定的。

（二）DNA 的变性和复性

DNA 双螺旋结构的生物学功能主要在于复制和转录。通过加热可以使 DNA 双螺旋的氢键断裂，双链解离，形成单链 DNA，此即为 DNA 高温热变性。然而在解除变性的条件之后（如降低温度），变性的单链又可以重新结合起来，形成双链，其原有的物理性质和生物活性恢复，这称为 DNA 复性，也叫低温退火。变性和复性在一定条件下是完全可逆的。DNA 双链离解一半的温度称为解链温度 T_m。不同的 DNA，T_m 不同，T_m 范围一般在 85～97℃。哺乳动物基因组中，当 DNA 含 40%G-C 时，$T_m \approx$ 87℃；而含 60%G-C 时，$T_m \approx$95℃。因此 PCR 高温变性温度在 90～97℃选择，加热时间为 1～2min。

（三）几种非标准的 PCR 技术

非标准的 PCR 技术可以分为：锚定 PCR、反相 PCR 和不对称 PCR 等。锚定 PCR 可以克服未知序列带来的障碍；反相 PCR 可以扩增一个已知 DNA 片段两侧不知序列；不对称 PCR 可以产生大量的单链 DNA。

二、PCR 的基本原理

PCR DNA 扩增是一个周期性的变温过程。每一周期包括 3 种温度的保持和转换，即①高温（90～97℃）热变性，使模板 DNA 由双链解开成 A、B 两条单链；②低温（37～65℃）退火，此时一对与模板 DNA 双链序列互补的寡核苷酸引物 A′、B′，在溶液中与两条单链 DNA 模板杂交，形成局部的双链；③在中等温度下（70～75℃），经耐热 DNA 聚合酶（*Taq* 酶）催化，以四种 dNTP 为原料，引物 A′、B′ 为复制的起点，按模板 DNA 序列，从 5′端到 3′ 端的方向延伸成两条新的 DNA 双链。一个温度循环（3～6min）后，DNA 拷贝数增加 1 倍。将上述变性-退火-引物延伸三步循环反应反复进行 n 次，则模板 DNA 增加 2^n 倍。这样经过 25～30 个 PCR 循环，可得到上百万倍的扩增。

三、最适条件及影响因素

1. 变性温度及时间

模板 DNA 和 PCR 产物的变性不充分是 PCR 失败的主要原因。适宜的变性条件是 95℃×30s，富含 G-C 的模板要求较高的温度或较长的时间。变性温度太高或时间太长，会使酶活性遭受不必要的损失。

2. 引物设计及引物退火

（1）引物长度

15～30bp 的寡核苷酸与模板 DNA 3′端互补，因为扩增时引物从 5′向 3′方向延伸，所以引物 3′端必须与模板严格互补，经常在 5′端引入限制性内切核酸酶位点。

(2) 引物碱基组成

G+C 占 50%～60%，避免数个嘌呤或嘧啶的连续排列。引物间尤其在 3′端不能有两个以上碱基互补，引物本身应避免回文序列。

(3) 退火

当引物长度在 15～30bp 时，T_m(℃)=GC×4+AT×2；退火温度 $T=T_m-5$℃。

适当提高退火温度可增强辨认能力，有助于 PCR 的特异性。

3. 引物延伸

引物延伸时间决定于模板序列的长度、浓度及延伸温度。一般延伸在 72℃ 进行，这一温度接近于 M13DNA 为模板的最适延伸温度。

4. 引物及模板浓度

(1) 引物浓度

引物浓度一般为 0.1～0.5μmol/L；过高的引物浓度会导致错配和非特异产物堆积，同时会增加生成引物二聚体的概率，引物浓度过低又必然会引起扩增效率降低。

(2) 模板浓度

不同的模板量对 PCR 中特异性扩增的效果影响很大。模板过低时（100μl 体系中 3.3×10^{-6} pg），特异性扩增减少，而非特异扩增增加。为获得良好的实验结果，一般采用每 100μl 含 10^5 个拷贝。

5. Mg^{2+}

Mg^{2+} 浓度过高，特异性降低；浓度过低，产物产量减少。各种单核苷酸浓度为 200μmol/L 时，Mg^{2+} 浓度为 1.5～2.0mmol/L 较为合适。

6. dNTP

高浓度 dNTP 易产生错误掺入；浓度过低的 dNTP，则会降低反应物的产量。一般反应体系常用 50～200mmol/L。四种脱氧三磷酸单核酸的浓度应相同，否则会诱发聚合酶的错误掺入作用，降低合成速度，过早终止延伸反应。

7. 聚合酶用量

PCR 100μl 反应体系中 DNA 聚合酶的用量为 1～2.5μl。当 DNA 和引物以及其他条件发生变化时，酶用量也会有差异。若酶用量过高，非特异性产物堆积；酶用量偏低，则合成产物量少。

8. 循环次数

常规 PCR 一般为 25～40 个周期。随着周期次数增加，DNA 聚合酶活性减低，延伸时间变长，引物单核苷酸减少，反应后期容易发生错误掺入。所以在满足产物得率的前提下应尽量减少周期次数。

9. 其他反应组成物

(1) Tris-HCl 缓冲液

Tris-HCl 既是维持 pH 的试剂，又起到增强离子强度的作用，从特异性扩增较好而非特异扩增能力较低的情况来看，选用 Tris-HCl 浓度为 25mmol/L 较为合适。

(2) $(NH_4)_2SO_4$ 浓度的影响

经过实验证明，$(NH_4)_2SO_4$ 和 KCl 在 PCR 体系中都能起作用。考虑到 SO_4^{2-} 离子对重金属离子有一定结合能力，所以选用 $(NH_4)_2SO_4$，其浓度一般选用 25mmol/L 有较好的扩增效果。

(3) 体系 pH

体系 pH 由 Tris-HCl 缓冲液调节。当 pH 在 7.7～8.2 电泳时均可看到清晰条带；pH 为 8.4 时特异性扩增减弱；当 pH 小于 7.5 时，无特异扩增条带。所以一般选择 pH8.0 的 Tris-HCl 作缓冲剂。

(4) 蛋白质保护剂

保护剂一般选用明胶或小牛血清白蛋白。从实验结果来看加入保护剂可提高扩增效率，不加保护剂则会造成实验结果不稳定。一般可选择加入适当浓度的明胶作保护剂。

10. 甲酰胺作用

在反应体系中加入了 5%甲酰胺溶液的实验发现，甲酰胺具有提高反应灵敏度、抑制非特异性、降低 DNA 的 T_m 值（50%甲酰胺，T_m 值下降 30℃）和增加 DNA 复性时的碱基特异性配对的功能。

四、PCR 扩增过程中的问题及建议的解决方案

1. 没有获得预期的 PCR 产物

1) 确认是否加入 *Taq* 酶，检查 *Taq* 酶是否有活性。

2) DNA 解链是否充分。

3) 人工合成的引物是否合适。

4) 在未加 DNA 聚合酶前将反应系统在 95℃保温 5～10min，使蛋白酶及核酸酶失活。

2. PCR 产物凝胶电泳呈扩散状

1) 减少 DNA 聚合酶的浓度。

2) 增加退火温度。

3) 降低 Mg^{2+} 浓度。

4) 减少退火时间及延伸时间。

5) 减少周期次数。

3. 凝胶电泳中出现引物二聚体条带

1) 检查引物 3′端是否互补。

2）重新设计较长的引物。
3）增加模板 DNA 的量。
4）降低引物浓度。
5）减少周期次数。
6）提高退火温度。

4．PCR 产物特异性不高

1）提高退火温度。
2）减少退火时间及延伸时间。
3）降低引物和聚合酶的浓度。
4）改变 Mg^{2+} 浓度。

第二节　PCR 仪的组成与结构

基因扩增的技术设备由三部分构成：①模板 DNA 制备所需设备，主要为高速微量离心机或高速冷冻离心机；②PCR 基因扩增仪；③DNA 扩增结果判读和测定设备，主要有水平低压电泳仪、PCR 核酸电泳槽以及紫外透射仪和 DNA 微量荧光计等。

基因扩增仪的技术方案可归结为两大类：第一类方案即三容器机械手循环方案。该类设计根据恒温器的排布可分为直线型和环型两种。该方案设计的 PCR 仪设置三个精确控温及温度可调的恒温器，并且固定不动，使样品盘在微电脑控制的机械手作用下，根据 PCR 反应所需的保温时间，在恒温器之间停留和循环。第二类方案即单容器温度循环方案。该类方案在整个反应过程中，样品在样品槽中位置不变，而通过控制样品槽温度的升降完成温度的转换、保持和循环。该类方案的设计根据加热、冷却方式的不同可分为光加热、空气流冷却型，电热丝加热、压缩机或半导体制冷器冷却型以及半导体制冷器冷却、加热型等。

按照以上两种方案设计的 PCR 仪，根据样品槽的不同还可分为空气浴型和金属样品槽型。前者样品管架在空气浴中，通过气流的变温实现 PCR 热循环；后者样品管放置在金属样品槽孔中，通过金属样品槽的变温实现 PCR 热循环。近年来，在上述各种方案基因扩增仪的基础上，通过结构改变又派生出各种新型的 PCR 仪。例如，为了防止样品管中试剂的挥发，在样品槽上加一热盖，形成了盖加热型 PCR 仪；为了进行原位杂交，设计能放置载玻片的样品槽，形成原位 PCR 仪；为了加速 PCR 反应、节省试剂、提高特异性，用毛细管代替离心管，形成了毛细管型快速 PCR 仪。

总体说来，第一类方案的优点是：温度转换快，耗时少，变温速度可达 10℃/s，因而温度转换率和 DNA 扩增效率均高于第二类方案。温度均匀性更易保证，而且对样品管的适应能力很强，不仅能用离心管、薄壁管，而且可做最新发展的毛细管 PCR 以及采用载玻片的原位 PCR。硬件方面，因省去了制冷器，设备比较简单，降低了成本也容易控制和维修，提高了仪器的可靠性。由于 PCR 的退火温度通常都在 42℃ 上，因而该方案无制冷器的缺点并不影响 DNA 扩增的效果和质量。该方案的不足之处是由于

温度升降太快，可能影响聚合酶的活性。此外由于省去制冷器，使温度下限受到环境温度的限制，温度程序的灵活性小，仪器体积较大。

第二类方案的优点是由于引进了制冷器而易于变温，从而增加了温度变换程序的灵活性，仪器体积也比较小。主要缺点是由于在一个容器中进行温度循环，温度转换率将受到限制，且温度均匀性和运行效率均不如第一方案。在硬件方面，如果采取压缩机制冷将增加体积和成本；采用半导体制冷器（帕尔帖元件），则由于热应力作用于帕尔帖元件焊接面，经多次循环将导致焊接面开裂而损坏。新近发展的空气浴、流体冷却、毛细管快速 PCR 仪，由于采用毛细管作样品管，利用高速气流强制冷却，在提高温度转换率和温度均匀性方面提出了新的措施。

目前，国内外已有多种 PCR 自动扩增仪，这些仪器总体上可分为：样品承载装置、电源装置和微处理控制模块三个主要部分。最新型号的仪器已将仪器完全用计算机进行控制，其自动化程度和数据处理功能得到进一步加强。例如，PERKIN ELMER 公司的全自动 PCR 仪，利用压缩机制冷，半导体加热，配有盖加热板，温度控制准确，升温、降温速率快，且管槽间的温度均一性较高。备有温度校验仪，还可随时检查孔内温度情况，避免失误操作；自动化程度高，所编程序随时存储，并可随时调用，也可对所编程序进行打印，作为撰写论文最为方便和最可靠的原始条件，并可随时观察比较，其结构见图 19-1。

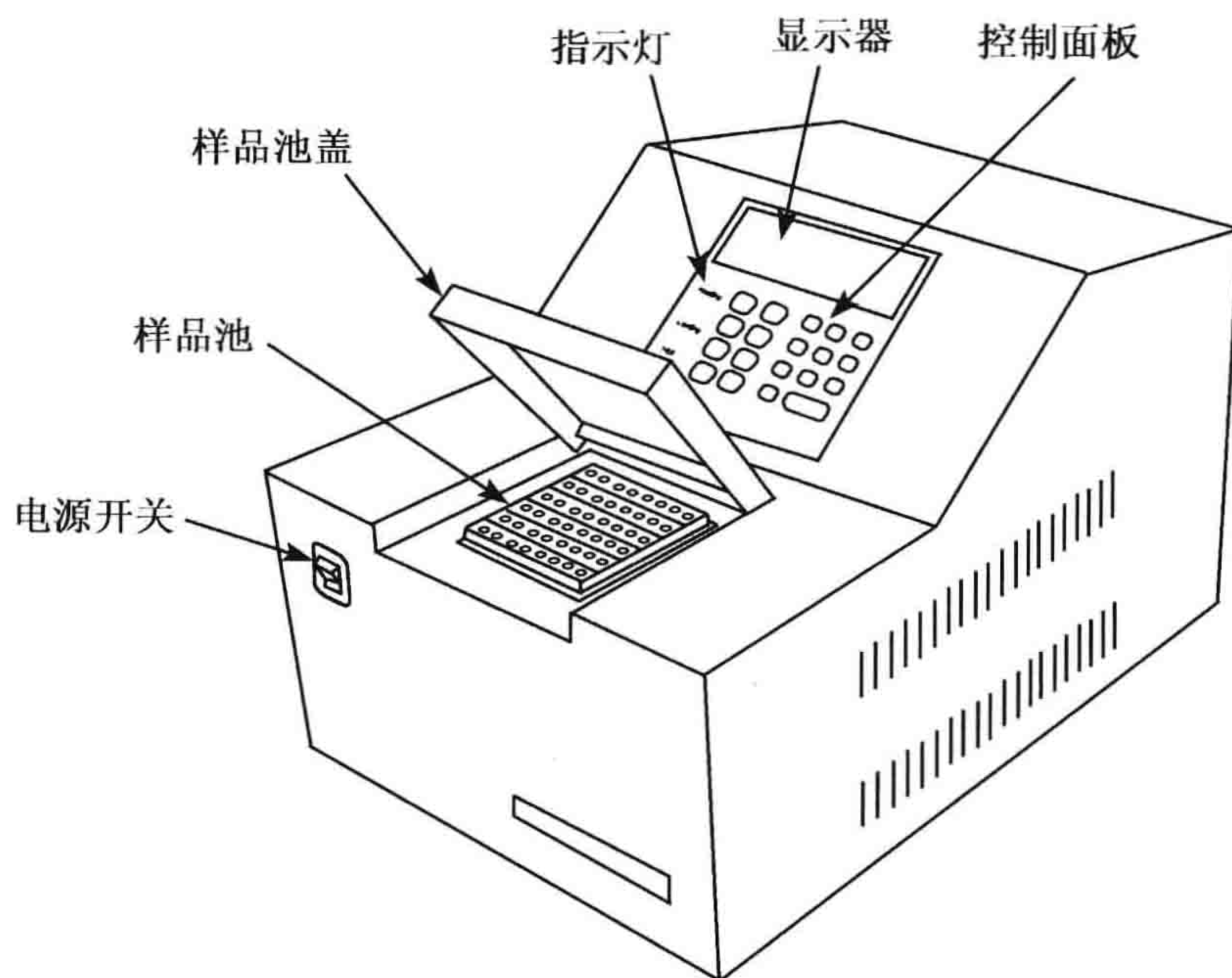


图 19-1　PE480 PCR 仪结构图

第三节　使用操作

一、PCR 参数设定的基本原则

一个 PCR 反应开始，首先是双链 DNA 解离为单链，使之有利于与引物结合，该

过程可以通过加热来完成。在 90～95℃条件下，即使复杂的 DNA 分子，如人基因组 DNA 也可变性成单链，根据模板 DNA 复杂程度，可以调整变性温度和时间。一般情况下选择 94℃、30s 可使各种复杂 DNA 分子完全变性。过高温度或持续时间过长，对 *Taq* DNA 聚合酶活性和 dNTP 分子都会造成损害。

变性后的 DNA 很快冷却至 40～60℃，即可使引物和模板 DNA 发生结合。这是由于模板 DNA 结构比引物复杂得多，引物和模板之间碰撞的机会大大高于模板互补链之间的碰撞。复性温度的选择，可以根据引物的长度和其 G＋C 含量确定。引物长度为 15～25bp 时，退火温度可通过 $T_m=4\times(G+C)+2\times(A+T)$ 计算得到。在 T_m 允许的温度范围内，选择较高的退火温度可大大减少引物和模板之间的非特异结合，提高 PCR 的特异性。退火时间设置为 30s，足以使引物和模板之间完全结合。PCR 反应的延伸温度为 70～75℃，此时，*Taq* DNA 聚合酶具有最高活性。引物在 16 个核苷酸以下时，过高的延伸温度不利于引物和模板的结合。可采用反应温度缓慢升高到 70～75℃的方法。因为在最初较低温度下，DNA 聚合酶已催化延伸反应开始，随后的较高温度不会对“延长”过的引物和 DNA 模板的结合发生影响。PCR 延伸反应的时间，可根据待扩增片段的长度而定。一般 1kb 以内的片段，延伸时间 1min 足够。扩增片段在 1kb 以上则需增加延伸时间。

以上参数确定后，PCR 循环次数主要取决于模板 DNA 的浓度。理论上 20～25 次循环后，PCR 产物的积累即可达到最大值。实际操作中由于每步反应的产率不可能达到完全，因此不管模板浓度多少，20～30 次是比较合理的循环次数。循环反应的次数越多，非特异性产物的量也会增加。

二、PCR 仪的使用（以 PE480 为例）

1）打开电源开关，仪器进入操作首画面，预热 10～15min。

2）打开样品盖，在要使用的样品孔滴入少量油滴，用于确保扩增管中样品温度的均一性。

3）旋紧样品管，去除空气间隙，防止热循环过程中样品管滑进样品槽中。盖上样品加热盖。

4）按照屏幕显示，按 FILE 键，选择方法，按 START 键运行。或者点击 STEP 键，编辑方法文件。对 PCR 的变性（Seg 1）、退火（Seg 2）、延伸（Seg 3）的目标温度和延续时间进行设定（PE480 的延续时间从离目标温度差 1℃时计时），既可使用仪器的默认值，也可重新设定。对反应的变性温度和延伸温度，仪器的默认设置可在 1s 内达到设定温度，也可通过编程使温度递增速度适当减慢。

5）设定终止温度和持续时间（Seg 4），通常接受其默认值，温度 0℃，时间 0s，也可在－5～－1℃进行温度和持续时间的设定，用于扩增产物在仪器中的过夜保存，以防扩增产物变性。

6）对变性、退火、延伸 3 个阶段温度循环进行单个循环的补充（此功能仪器的默认设置为“NO”）。

7）设置循环次数（仪器的默认值为 25）。

8）方法存储。

9）运行存储的方法（也可打印方法参数）。方法中终止温度（Seg 4）若设定为负值，即可对扩增样品进行过夜保存。

10）按 STOP 键，终止操作。

11）取出样品用于分析。

三、PCR 仪常见故障的排除

下面以 PE480 PCR 仪为例，介绍 PCR 仪器使用过程中遇到的基本故障以及排除方法。

1. 打开电源但是仪器不响应

这种情况很可能是由于电源线脱落或者没有插紧而致，将电源线重新插入插座即可排除故障。

2. 屏幕无显示且马达与风扇不启动

这种情况很可能是总保险丝被熔断而造成的，更换保险丝即可排除故障，更换准确型号保险丝是所有用电仪器常见的故障排除办法，需要注意的是更换时一定要严格按照使用说明书来进行，或者邀请生产厂家维修工程师来完成。

3. 插上电源但是屏幕空白或当按下某一按键时屏幕不显示相应的画面

这种情况可能是逻辑电路或者电源的保险丝被熔断，也有可能是控制器的缘故。更换保险丝后若不能排除故障，请向维修工程师咨询。

4. 显示的样品池温度不正确

一般的 PCR 仪附件中都含有温度校准设备，用于定时对各样品孔的温度进行校准或者用于定期检查各样品孔温度的均一性，有的设备将其作为标准配置，购买时不需另行定购，但有些品牌的仪器将其作为选购件，购买时就得选配。PE480 PCR 仪 RTD 探测器包括两个探头，黑色探头用于检测样品池的温度，而银色探头不用于检测样品池温度。需要注意：探测器在 3min 之后方能达到一定精确度，而样品池在 1min 之内就可以达到设定值。

如果 PE480 PCR 仪显示样品池温度不正确这种情况很可能是温度需要重新校正，通过校正仪器可以通过微处理机对控温装置的控制程序进行重新设定，以便准确有效地进行温度控制，其具体操作步骤如下：

1）启动仪器，预热 15min。

2）按照如下参数，建立一个双温循环文件：

Segment＃1 Temperature＝95℃

　　Segment＃1 Time＝3：30minutes

Segment＃2 Temperature＝40℃

Segment＃2 Time＝3：30minutes

Segment＃3 Temperature＝0℃

Segment＃3 Time＝0：00minutes

Auto Segment Extension：off

Cycle Count＝99

Link to shut-off（0）

3）用棉签蘸取矿物油涂抹两个样品孔 C1、C2 用于样品孔保温。将探测器黑色探头插入样品孔 C1 而银色探头插入样品孔 C2，确保探头连线与电子温度计相连。

4）压紧探头，将热盖关上，将 1 磅的砝码置于加热盖上，确保探测器准确定位于样品孔中。

5）将温度计最高温度调整到 200℃，打开开关。

6）运行第 2）步中建立的双温循环。

a. 在第三个循环中，当 Segment＃1 中的时间为 30s 时记录样品孔 C1 的温度，记为 T(95)。

b. 仍在第三个循环中，当 Segment＃2 中的时间为 30s 时记录样品孔 C1 的温度，记为 T(40)。

7）利用下列公式，参考给出的高偏移值（High Offset）计算样品池维持在 95℃时的温度：

样品池在 95℃时的平均温度＝T(95)－High Offset

如果样品池的温度与设定温度的差值大于 1℃，该 PCR 仪则需要重新校正。

8）利用下列公式，参考给出的低偏移值（Low Offset）计算样品池维持在 40℃时的温度：

样品池在 40℃时的平均温度＝T(40)－Low Offset

如果样品池的温度与设定温度的差值大于 1℃，该 PCR 仪则需要重新校正。

9）从样品池中取出探测器并关闭电子温度计。

5. 加热或冷却速度缓慢

这种情况很可能是控制器或机械故障造成的。需要运行诊断测试并记录加热速率。运行一个 4℃ Soak file，或观察是否能在 15min 内上升到所设温度。如果这两个测试都宣告失败，请向维修工程师咨询。

6. 开机时出现错误信息

这种情况有可能是仪器某一系统启动失败或者电压太低造成的。确保同一电路中没有使用其他电器，不要在已有用电器电路上增设线路。若排除电压太低这一原因，请向维修工程师咨询。

四、PCR 仪的维护保养

虽然 PCR 仪器不是一种计量仪器，但其主要作用原理与基本计量要素密切相关，

要求较高，一旦失控，仪器将不能正常工作，所以PCR仪器也需要定期检测和维护，这对依赖自然风降温的PCR仪器尤为重要。在仪器的维护保养中，需要注意以下问题：

1）PCR仪器需要定期检测，视制冷方式而定一般半年至少一次。

2）PCR反应的要求温度与实际分布的反应温度是不一致的，当检测发现各孔平均温度差偏离设置温度大于1～2℃时，可以运用温度修正法纠正PCR实际反应温度差。

3）PCR反应过程的关键是升、降温过程的时间控制，要求越短越好，当PCR仪的降温过程超过60s，就应该检查仪器的制冷系统，对风冷制冷的PCR仪要较彻底地清理反应底座的灰尘；对其他制冷系统应检查相关的制冷部件。

4）一般情况如能采用温度修正法纠正仪器的温度时，不要轻易打开或调整仪器的电子控制部件，必要时要请专业人员修理或利用仪器电子线路详细图纸进行维修。

下面介绍一些具体的保养维护方法。

1. 样品池的清洗

先打开盖子，然后用95%乙醇或10%清洗液浸泡样品池5min，然后清洗被污染的孔；用微量移液器吸取液体，用棉签吸干剩余液体；打开PCR仪，设定保持温度为50℃的PCR程序并使之运行，让残余液体挥发去除。一般5～10min即可。

2. 热盖的清洗

对于荧光定量PCR仪，当有荧光污染出现，而且这一污染并非来自样品池时；或当有污染或残迹物影响到热盖的松紧时，需要用压缩空气或纯水清洗垫盖底面，确保样品池的孔镜干净，无污物阻挡光路。

3. 仪器外表面的清洗

清洗仪器的外表面可以除去灰尘和油脂，但达不到消毒的效果。选择没有腐蚀性的清洗剂对PCR仪的外表面进行清洗。

4. 更换保险丝

先将PCR仪关机，拔去插头，打开电源插口旁边的保险盒，换上备用的保险丝，观察是否恢复正常。

第四节　PCR的应用

一、PCR在生物学上的应用

（一）产生大量已克隆化双链DNA中的特定序列

利用载体上互补的寡核苷酸引物，克隆载体上的目的DNA片段。在一系列相互嵌套、渐进排列的引物引导下，进行一组PCR，可以除去目的DNA两侧多余的序列，也可在扩增的引物末端引入一些附加的核苷酸，如限制酶酶切位点，也可以生成一些缺失突变体。

（二）以少量 mRNA 生成 cDNA 文库

以 mRNA 为模板，以 Oligo dT 为引物，在逆转录酶的作用下，合成 cDNA 第一链，然后再通过 PCR 扩增该链，生成大量的双链 DNA。也可以酌情在引物的 5′端加上限制酶酶切位点，以利于将扩增所得的双链 DNA 克隆到适当载体中。

（三）选择性扩增特定 DNA 序列

已知某一目的蛋白质的氨基酸的部分序列，就可以设计两套特定的寡核苷酸引物，从 cDNA 第一链库中扩增目的序列。

（四）生成大量单链 DNA 进行序列测定

常规 PCR 后，反应后的 DNA 产物进行脱盐处理，除去过剩的 dNTP，通过互补于 DNA 扩增产物中某一适当区段的 P^{32} 标记寡核苷酸作引物，便可对 DNA 扩增产物进行序列测定。另外通过特殊的 PCR 方法，即不对称 PCR 也可扩增出单链 PCR。

（五）构建突变体和重组体

利用引物设计上的一些变化，通过几次 PCR 反应，可以构建出基因的突变体和重组体，以便于研究基因的一些性质。

此外，还可以进行酵母菌落分析、检查酵母内的遗传操作、小载体 PCR 和单一位点 PCR 用于捕获克隆在 YAC 中的基因组 DNA 末端序列，也用于分离与克隆的 DNA 或已知的 DNA 序列紧邻的 DNA。

二、PCR 在基因诊断中的应用

人类疾病的发生常涉及内源基因的突变和外源基因的入侵。前者发生在体细胞的基因突变引发各种肿瘤，而发生在性细胞的基因突变则引起各种遗传病；后者，例如，各种微生物病毒和寄生虫感染机体把它们特异的基因带入人体，并在体内增殖，从而引起各种传染病。通过基因（DNA 或 RNA）分析，快速、灵活地诊断疾病，即为基因诊断。

近年来基因诊断发展十分迅速，特别是出现基因体外 PCR 扩增技术以后，使诊断速度、灵活度和特异性大为提高，目前已经可以检查出几个拷贝的基因或基因中存在的缺陷，从而解决了医学中许多难题。PCR 技术在临床基因诊断中的应用，正随着 PCR 临床诊断方法学研究的推进和试剂盒的开发而不断地扩展。已在以下方面得到应用，并正在日益推广。

（一）PCR 技术应用于遗传病的诊断

相当一部分遗传性疾病严重危害健康，因此，如何及早做出正确诊断，特别在妊娠早期发现携带致病基因的胚胎，并采取相应措施及早终止妊娠，对于优生优育有十分重要的意义。PCR 技术应用于基因诊断，可使 DNA 序列扩增 10^5～10^6 倍，使 DNA 的样

本量大大减少（hg～pg 水平），分子完整性的要求也不那么严格。只要取几滴羊水，几根胎儿绒毛，有时甚至取卵裂期的一个细胞便能进行分析。

PCR 技术的发展和完善，使严重遗传性疾病的产前诊断成为可能，并得到迅速发展。目前对于镰形细胞贫血病、地中海贫血、抗凝血酶 III 缺乏症、血友病、DMD（假肥大性肌营养障碍）以及囊性纤维病等遗传病，已研究出相应的试剂盒和检测方法，可采用 PCR 技术作产前诊断。

（二）PCR 技术应用于病原体的检测

1. 应用于病毒感染的诊断

目前 PCR 技术已开始用于甲、乙、丙、戊型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、巨细胞病毒、乳头瘤病毒、单纯疱疹病毒、风疹病毒、狂犬病毒、EB 病毒以及柯萨奇病毒等所引起人类感染病的诊断。如乙型肝炎病毒（HBV）感染，通常采用的反向血凝法和酶联免疫吸附法（ELISA），两者均为间接检测体内有无 HBV，敏感度只能达到 0.1μg/ml。而用 PCR 技术则是直接测血清中是否存在 HBV DNA，在 5μg 血清中含 10fg HBV DNA 都能检出，比常规方法灵敏度高 50 000 倍。

2. 细菌、原虫等病原体的检查

PCR 技术适合于结核杆菌、肺炎以及性病病原体等的检查。如性病中发病率最高的淋球菌检查，一百多年来均使用涂片与培养法，而 PCR 技术是一种非培养的基因诊断技术，特别适用于淋病的快速诊断和流行病学调查。

3. PCR 技术用于恶性肿瘤的诊断

恶性肿瘤是危害人类健康的主要疾病之一，多数学者认为细胞癌基因的激活或过表达、抑癌基因的丢失或其表达产物的失活，或两者兼有，均会引起细胞无限制的生长而形成癌症。然而癌基因的活化或抑癌基因失活的原因不外乎是体细胞基因的点突变、缺失、片段的插入或异位等引起。因此采用 PCR 技术进行基因分析显然是恶性肿瘤诊断的一种有效方法。

三、PCR 在法医物证学上的应用

检测法医标本的 DNA 多态性是法医学的一项重大发展。只要标本中的 DNA 尚且完整并有足够的量，那么，采用限制性内切核酸酶片段长度多态性分析（RFLP）就可以得到一个个体特异的 DNA 指纹图。PCR 技术以它特有的高灵敏度、高特异性和快速的反应时间为 DNA 多态性分析提供了有力的工具。

目前，PCR 技术在法医物证检验中已有种属鉴定、性别鉴定、个人识别和亲子鉴定等几个方面的应用。

四、PCR 在器官移植上的应用

器官移植是治疗重要器官晚期实质性病变所致功能衰竭的最好办法。器官移植的成功与否，关键问题之一是宿主对移植器官是否产生排斥反应以及反应的强度。因此，实现器官移植的一项重要内容就是进行人的组织相容性系统的测定。目前流行的测定 HLA 的方法主要是血清学方法和细胞学方法。但是，这两种方法均有操作繁琐、材料来源困难、保存要求高、花费时间长的缺点。而且，以上述方法 HLA 的某些等位基因仍无法检测。PCR 技术能直接做基因分型，具有操作简单、方便、快速、灵敏等特点，而且不会受到抗 HLA 血清和活淋巴细胞等方面的限制，对器官库的建立将提供十分有用的技术手段。

第五节 新型 PCR 分析方法及新型 PCR 仪

一、荧光定量 PCR 技术

聚合酶链式反应（PCR）可对特定基因进行扩增，因此广泛应用于获取特定基因或基因片段及临床基因诊断等领域。早期最成功普及的应用领域是获取某一目的基因。用于基因诊断有许多局限性，一是不能准确定量；二是由于太灵敏，容易交叉污染，产生假阳性。为克服上述不足，人们采取了许多方法，如杂交法、竞争法、酶联法及尿苷酶降解法等，但均不很成功。荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer, FRET）是指通过供受体发色团之间偶极-偶极相互作用，能量从供体发色团转移至受体发色团，转移效率与两个发色团之间距离的 6 次幂倒数成比例。直到 FRET 应用于 PCR 定量后上述问题才得到较好的解决，并扩大了 PCR 技术的应用，如可广泛应用于临床观测患者病情发展及预后，判断药物疗效等。FRET 在结构生物学、生物化学及分子距离测定的多学科内也有广泛的应用价值。

聚合酶链式反应凭借敏感、特异、快速的特点荣获 1993 年诺贝尔化学奖。因其在病原体检测方面的独特优势，因而发达国家在相关方法和仪器方面的研发非常快，成为分子生物学诊断的主流，至今仍处于学术和应用前沿。PCR 仪器经历了三代产品。

1）第一代产品：基因扩增热循环仪（DNA thermal cycler）＋电泳仪＋紫外分析仪＋定性试剂，构成 PCR 定性检测。

2）第二代产品：基因扩增热循环仪＋荧光仪＋终点定量试剂，构成 PCR-DNA 终点法定量检测（end-point quantitative PCR detection），又分为终点酶免定量（end-point ELISA-PCR）和终点荧光定量（end-point fluor-PCR）两种。

3）第三代产品：实时定量 QPCR 仪＋实时荧光定量试剂，构成 QPCR-DAN/RNA 实时荧光定量检测。

基因分析的定量化和均相化是未来基因诊断的发展趋势，目前在该领域的研究刚刚起步，仍有许多问题需要解决，如分析灵敏度及重复性、自动化仪器和试剂成本、样品处理及多基因同时分析等。生物芯片技术与荧光探针定量技术的结合将有助于上述问题

的解决，届时将大大推动该技术的在生命科学领域的应用普及特别是临床诊断领域的推广。

二、毛细管 PCR 技术

常规 PCR 反应采用导热性较差的塑料管作为反应容器，对于 100μl 样品，样品温度要比槽板温度滞后 20～30s，加上槽板升降温度较慢（1℃/s），因此 30 个循环反应通常需要 2～6h，循环时间多浪费在加热和冷却样品过程中，不能满足临床快速诊断的需要。毛细管 PCR 由于采用导热性远强于塑料管的毛细管作为反应容器，使得样品温度滞后时间小于 1s，对于扩增 500bp 的片段，延伸反应 10s 就可完成；对于 10μl 的样品，变性和复性均能在 1s 内完成；另外，毛细管 PCR 仪采用高速空气流作为加热和冷却的介质，保证了温度的均一性、温度的迅速变化及样品和空气间的快速热传导，使得样品温度变化率可达 5～10℃/s，因此毛细管 PCR 仪能够在短至 15min 内完成 30 个循环。而仪器方面则出现了相应的附件用于承载装有样品的毛细管。目前，PCR 的发展主要集中在扩增条件的完善、扩增产物检测方法的改进和扩增产物由定性分析向定量分析转变上。

三、实时 PCR 仪器

实时 PCR 的主要优点在于在一种巨大的动力学范围内测量核酸分子浓度的能力，并且以它的高灵敏度与大容量的并行操作为特征，能同时检测许多样品。与传统的 PCR 产物的终点测量法不同，实时 PCR 提供关于 PCR 的动力学的瞬时信息，因此在不同样品之间扩增效率方面的差异能够通过计算获得补偿。目前，三种最通用的实时 PCR 仪器是 GeneAmp5700 序列检测系统、ABI 光谱 7700 序列检测系统（二者均由 Perkin-Elmer Biosystem 公司出品）和 Light Cycler。

（一）实时荧光定量 PCR 的技术

实时荧光定量 PCR（real-time quantitative PCR）技术是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。在实时荧光定量 PCR 技术的发展过程中，两个重要的发现推动了荧光定量技术的大力发展：在 20 世纪 90 年代早期，*Taq* DNA 多聚酶的 5′核酸外切酶活性能降解特异性荧光记探针的发现，使得间接地检测 PCR 产物成为可能；此后荧光双标记探针的运用使在一密闭的反应管中实时地监测反应全过程得以实现。这两个发现的结合以及相应的仪器和试剂的商品化发展推动实时荧光定量 PCR 方法在研究工作中的运用。

（二）实时荧光定量 PCR 仪的工作原理

实时荧光定量 PCR 仪主要由样品载台、基因扩增热循环组件、微量荧光检测光学系统、微电路控制系统、计算机及应用软件组成。

样品载台的容量常见的是 36 孔、48 孔、96 孔、384 孔。

基因扩增热循环组件工作原理与传统基因扩增仪大致相同，不同厂家不同型号的产品分别采用空气加热、压缩机制冷、半导体加热制冷等工作方式。

微量荧光检测系统由荧光激发光学部件、微量荧光检测部件、光路、控制系统组成。常用的荧光激发方式有两种：卤钨灯和 LED；荧光检测元件常用两种方式：光电倍增管和冷光 CCD 摄像机，光单色元件有滤光片和光栅。探测光路设计，有的厂家采用步进电机加导轨的装置带动探测器的检测位置来测量每个样本的荧光，如博日公司的"Line-gene"实时定量 PCR 仪；有的产品采用光开关来转换荧光检测位置，如西安天隆科技有限公司的"TL998A"型实时定量 PCR 仪。

配套的计算机和软件提供热循环编程、数据分析、热循环温度和荧光值实时监测图形显示、数据库管理等功能。

（三）实时荧光定量 PCR 仪的特点

实时荧光定量 PCR 由于应用了光谱技术，与计算机技术相结合有较多的优点，敏感性大大提高。与普通 PCR 模式相比，实时荧光 PCR 具备以下几个方面的特点和优势。

1）光谱技术与计算机技术的联合应用提高了灵敏度，有效的减少了劳动量。TaqMan PCR 使用特定波长的激发光来激发荧光的产生，利用灵敏光探测器检测荧光信号的大小，通过计算机的分析软件进行分析，灵敏度很高，可以检测到单拷贝的基因，这是传统 PCR 难以做到的。

2）由于扩增产物的检测在 PCR 扩增过程中同时进行，并且数据的采集分析全部由仪器自动完成，因此整个检测所需的时间比普通 PCR 要节省许多。

3）能有效避免污染。传统的 PCR 在扩增结束后需要电泳仪或紫外光下观测结果，除了有污染外，还对人体产生一定的伤害；而荧光实时定量 PCR 在全封闭状态下实现扩增及产物分析，有效地减少了污染对人体的伤害。在大批量的标本检测中能有效地减少劳动量。

4）能精确定量。由于 PCR 的平台效应，传统的 PCR 不能进行精确的定量，而荧光定量 PCR，由于利用扩增进入指数增长期的 CT 值来定量测量起始模板的量，从而实现了极为精确的核酸定量检测，其精度可达每毫升 100 拷贝。

5）实时 PCR 检测功能强大，具备定性、定量、突变、多项目等检测功能。而普通 PCR 要完成上述项目需采用不同的技术平台。实时荧光 PCR 进行定量检测时，其定量线性范围比普通 PCR 要宽得多，可达每毫升 100～1010 拷贝。

随着反应试剂、仪器和操作系统的不断发展和完善，以实时荧光 PCR 技术为核心的检测试剂盒纷纷问世，逐步趋向于呈现灵敏特异、快速精确和操作自动化的特点。当然，由于成本较高，操作难度较大，目前在临床疾病的诊断和治疗上还未得到普及。因此，如何进一步提高检测方法灵敏度、简化操作程序、缩短检测时间、消除非特异干扰，以及采用统一的、标准化的方法已成为实时荧光 PCR 检测试剂盒未来研究的主要方向。许多研究者趋向于将更多的精力投入实时荧光定量 PCR 方法的研究开发，使之进一步最终自动化，来提高临床检验结果的准确性。在不久的将来，实时荧光定量

PCR 技术将以其显著的优势，在分子生物学、实验医学，特别是在临床医学领域达到越来越广泛的应用。

（四）实时定量 PCR 仪

定量 PCR 仪是基因定量扩增检测的主要设备，目前，国内外众多厂家根据不同的定量原理及用途，设计出各种各样的 PCR 仪，为基因定量的应用提供了更加广阔的应用空间。国内外主要生产厂家和产品有：美国应用生物系统公司（ABI 公司）——ABI7700、ABI5700、ABI7900；瑞士 Roche 公司——Lightcycler；美国 Stratagene 公司——MX3005P；MJ Research（现归美国 Bio-Rad Laboratories）—— DNA Engine Opticon™ System；日本独资杭州博日科技有限公司——Line-Gene 荧光定量 PCR 检测系统；加拿大独资上海枫岭生物技术有限公司 FTC-2000 型实时荧光定量 PCR 仪。西安天隆科技有限公司——TL998A 实时荧光定量 PCR 检测系统。

理论的发展会带动仪器的设计，而一些仪器设计技术的重大突破又推动研究理论的不断深入。近年来，PCR 扩增中不断出现新的问题，因此也推动了新仪器的不断出现。

主要参考文献

李建标，谭津，杨瑞馥等．1997．毛细管 PCR 技术在传染病快速诊断上的初步应用．中华微生物学和免疫学杂志，(2)：144～148

王小红．2001．荧光定量 PCR 技术研究进展．国外医学：分子生物学分册，(1)：42～45

第六篇　生物大分子制备系统及附属设备

生物大分子如核酸、蛋白质、多糖等，是生物有机体的重要组成部分，是生物学研究的基本对象，也是生命科学的基础。现代生命科学已经发展到分子水平上，需要从生物有机体中分离出这些生物大分子进行更加深入的研究，因此生物大分子的制备已成为生物学研究中的一个重要领域。目前，一些新型的高科技产品已经逐步取代了过去繁琐的人工操作，使得生物大分子的制备变得快速简便。本篇将详细介绍蛋白质和核酸的制备仪器——多肽合成仪和 DNA 合成仪，此外还将介绍在制备过程中常用的辅助设备——加样器和部分收集器。

第二十章　微量移液器

微量移液器替代了过去的玻璃吸管，作为一种方便有效的计量仪器已经被广泛使用。它的设计依据是虎克定律：在一定限度内弹簧伸展的长度与弹力成正比，也就是移液器内的液体体积与移液器内的弹簧弹力成正比。该仪器广泛应用于医药卫生、化工和科研单位，是各类实验室做生化测定、免疫实验及微量化学分析时对各种化学试剂、放射性同位素、生物制剂、无菌制剂、传染性、毒性和腐蚀性液体进行定量加液必不可少的工具。

第一节　移液器的检测与校准

一、实验室简单检测

（一）气密性检测

移液器吸满液体后，手持垂直放置15s，检查吸嘴的尖头有无液滴，如有，则说明漏气。

（二）准确性检测

1）量程小于1μl，建议使用分光光度法检测。将移液器调至目标体积，然后移取染料溶液，加入一定体积的蒸馏水中，测定溶液的稀释度（334nm或340nm），重复几次移液操作，计算移液器的精确度。

2）量程大于1μl，可以用称重法检测。通过对水的称重，转换成体积（体积＝质量/密度），鉴别移液器的准确性。由于水的密度是随着温度变化而变化，且称量天平本身精确度不符合检测要求，检测又大多在一个开放式空间内操作，偏差在所难免。因而，此种称量法只能现场粗略地判断移液器的准确性，进一步的校准必须在专业的实验室操作进行。

注意：称重法实验室必备条件是高度灵敏的分析天平（定期校准）、双蒸水和称量容器。水、移液器和吸嘴必须具有相同的温度（20℃时水的密度为0.099 82）。

二、专业校准

移液器的工作量大，长期使用，将会使弹簧弹力发生变形，加之本身是塑料，不耐摩擦，就会出现误差。为了保证移液器传递液体量的准确性，必须对移液器进行定期校准。为了更好地发挥该类计量仪器的作用，对新购进的仪器要进行校准才能使用；对正在使用的计量仪器，由于长期使用会造成其示值于度量对象的误差，这种误差若不进行控制，及时校正，必定会影响科研工作。因此，对使用的移液器要定期检定、校正，并

建立档案，只有这样才能使其在日常工作中更好地发挥作用。

目前，在许多实验室条件下进行的常规检测并不能完全取代专业的校准工作，因为校准对于外部环境、工作条件及使用的精密仪器具有较高的技术要求，而这些条件往往是大多数实验室无法提供的。现在一些大型的移液器制造商均采用全球统一的移液器标准操作规范，利用专业软件校正系统，通过计算机对分析天平进行在线控制，测量、数据采集、计算、结果评价等环节由软件控制完成，所有人为操作都被计算机记录随报告打印出来，采用电脑对数据进行评估认证，完全排除了人为操纵校准结果的可能性，并指定当地代理商提供专业的校准和维修服务。下面以 Eppendorf 公司为例，介绍其专业校准操作。

（一）校准的基本操作条件

操作室：独立房间，显示温度和湿度状态。

温度控制：15～30℃（±0.5℃）。

湿度控制：60%～90%。

工作台面：防震、防尘、远离热源、无阳光直射。

天平：0.000 01g 精密分析天平（小数点后 5 位），每年需由厂家进行校准。

防蒸发装置：Eppendorf 提供的湿度阱，防止称量液体的挥发。

测试介质：双蒸水，每 4h 更换一次，批次更换周期不大于 2 周。

（二）操作过程

1）同温化处理：校正前，所有移液器及校正介质（如工作台、天平、双蒸水等）置于相同操作间至少 4h，以确保它们具有相同的温度。

2）内外部清洗。

3）润滑活塞。

4）校准：采用三点校准法，即根据移液器量程范围，选取最低量程、中间值和最高量程三点分别测试 10 次，各个测试点取其平均值，计算其准确度（inaccuracy）和精确度（imprecision），评价标准符合 DIN 12650 要求。

5）校准报告：可根据客户需求提供计算机打印的标准报告或 PICASO 校正报告，符合 ISO、DIN 或 ASTM 相关标准。

三、影响准确性的因素

1）操作错误：包括 30℃手持移液器吸液；与吸嘴不匹配，较易造成脱落；残留的试剂倒流，污染活塞和密封圈；快速吸液排液，导致部分液体残留在吸头上等都会影响准确性。

2）移液器损坏：包括移液器的头部被刮擦，断裂受损；活塞受污染；弹簧受腐蚀等。

3）操作条件的影响：包括未作调整吸取与水不同密度的液体；样品和移液器的差别太大等。

第二节　性能特点

一、不同类型移液器的性能特点

Eppendorf公司1958年发明了世界第一只活塞微升移液器，1960年获得该发明的专利权，拥有各种规格的、品牌最齐全的微量移液器。其他的国际生产厂家还有美国TOMOS公司、德国BRAND公司和日本三洋公司等，国内厂家有北京青云航空仪表有限公司、大龙医疗设备有限公司等。下面以Eppendorf公司的产品介绍不同类型的移液器。

（一）整支可消毒移液器（Eppendorf公司Reference单道微量可调移液器4910）

性能特点：可显示4位数字；整支移液器可高温高压消毒；具有独特的单操纵杆结构；设计有容量调节旋钮安全锁，避免移液过程体积发生变化；下端细长，便于从窄长容器中移取液体；小量程（小于100μl）移液器为金属活塞；大量程（大于100μl）移液器为夹芯陶瓷活塞，耐磨、抗腐蚀；可根据按钮颜色选择适配标准吸嘴；可进行三点校正。

（二）半支可消毒移液器（Eppendorf公司Research系列）

性能特点：移液器上下端可拆离，下端部分可高温高压消毒；外壳采用新型抗UV材料；多道可调移液器，分为八道和十二道两类；尖端的橡胶环能确保紧密结合。

（三）电动移液器（Eppendorf电子移液器RESEARCH PRO 4860）

性能特点：具有三种操作模式（PIP、DIS、FIX）；液晶数字可显示吸取液量、连续加样次数和加样速度等多项指标；马达驱动加样，可充电；具有分配功能，最多可进行20次分配；可直接改变取液量，方便快捷；可直接测出余液量；可进行编程。

（四）PCR专用移液器（Eppendorf PCR专用移液器4830）

性能特点：主要用于PCR等精密实验；具有特殊的活塞吸嘴，确保无交叉污染；非空气活塞推动原理，手接触温度、液体的黏滞度等因素不会影响其精确度；具有独特的单操纵杆结构；可实行五点校正。

此外还有大容量移液器（Eppendorf大容量可调移液器Varipette）、电子连续移液器（Eppendorf连续多档分配器Multipette /Plus/Pro）、瓶口移液器（Brand公司瓶口移液器Dispensette®）、电子滴定器（Brand公司电子滴定器Digital Burette）等不同种类的移液器。

二、微量移液器头

微量移液器头与微量移液器配合使用，为实验室中主要的消耗品之一。由于制作工

艺简单，有众多生产厂家，一般分为三种类型：200～1000μl（蓝色）、20～200μl（黄色）、1～20μl（无色）。微量移液器头在基本形态基础上，根据实验需要不同而分为不同类型：① 在吸头与移液器连接的一端腔内加有气溶胶滤膜，防止不慎将样品吸到移液器本体内造成污染。特别是操作含有放射性核素样品时，更具有防护作用。② 吸头尖端加工成锥形，在吸取小量的液滴时，使用很方便。③ 直径为 0.3mm、0.03mm 的极细尖端吸头，用作向测序胶或聚丙烯酰胺凝胶的样品池中加样等。

无论何种吸头，在同一实验中不同实验者之间最好统一，万一出现计量上的错误容易发现。此外，为了减少残液留在吸头内壁，使用前应进行硅化处理。

第三节 使用方法

一、标准操作

适用的液体：水、缓冲液、稀释的盐溶液和酸碱溶液。

1）按到第一档，垂直进入液面几毫米。

2）缓慢松开控制按钮，否则液体进入吸头过速会导致液体倒吸入移液器内部，或吸入体积减少。

3）打出液体时贴壁并有一定角度，先按到第一档，稍微停顿 1s 后，待剩余液体聚集后，再按到第二档将剩余液体全部压出。

二、黏稠或易挥发液体的移取

在移取黏稠或易挥发的液体时，很容易导致体积误差较大。为了提高移液准确性，建议采取以下方法：

1）移液前先用液体预湿吸头内部，即反复吸打液体几次使吸头预湿，吸液或排出液体时最好多停留几秒。尤其对于移取体积大的液体（如 1000μl），建议将吸头预湿后再移取。

2）采用反相移液法：吸液时按到第二档，慢慢松开控制按钮，打液时按到第二档，部分液体残留在吸头内。

三、常见的错误操作

1）吸液时，移液器本身倾斜，导致移液不准确（应该垂直吸液，慢吸慢放）。

2）装配吸头时，用力过猛，导致吸头难以脱卸（无需用力过猛，选择与移液器匹配的吸头）。

3）平放带有残余液体吸头的移液器（应将移液器挂在移液器架上）。

4）用大量程的移液器移取小体积样品（应该选择合适量程范围的移液器）。

5）直接按到第二档吸液（应该按照上述标准方法操作）。

6）使用丙酮或强腐蚀性的液体清洗移液器（应该参照正确清洗方法操作）。

四、日常清洗和维护保养

为了确保移液器的准确度和精确度，应根据具体使用情况进行定期保养。特别是在

使用腐蚀性溶剂后，应该对移液器进行清洁。通过这些简单的清洁和保养方法，可适当地延长移液器的使用寿命。

1. 外部清洗

方法：根据使用情况，可以用洗洁精清洗，或用60%异丙醇消毒，然后用双蒸水淋洗，晾干。

2. 内部清洗

一般密封圈无需维护，活塞清洗或更换后需要涂上薄薄一层硅酮油脂（移液器每日用完后，应旋转到最大刻度，让弹簧恢复原形，有助于保持弹簧弹性）。针对不同性质的液体，有不同的清洗和保养方法，见表20-1。

表 20-1 不同性质液体的清洗和保养方法

处理的液体	操作特性	清洗和保养方法
水溶液和缓冲液	用蒸馏水校准移液器，结果非常准确	打开移液器，用双蒸水冲洗污染的部分，可以在干燥箱中干燥，温度不超过60℃。给活塞涂抹少量润滑油
无机酸/碱	如果经常移取高浓度的酸/碱液，可以偶尔用双蒸水清洗移液器的下半支。最好使用带有滤芯的吸嘴	移液器中使用的塑料材料和陶质活塞大都是耐酸耐碱材料（除了氢氟酸）。但酸/碱液的蒸气可能会进入移液器的下部，影响其性能，清洁方法同“水溶液”部分
具有潜在传染性的液体	为了避免污染，应该使用带有滤芯的吸嘴。或者使用正向置换方法移取	对污染的部分进行121℃、20min高压灭菌，或者将移液器下部浸入实验室常规的消毒剂中。随后用双蒸水清洗，并用上述方法进行干燥
细胞培养物	为了保证无菌，应使用带有滤芯的吸嘴	参照“具有潜在传染性的液体”的清洁方法
有机溶剂	密度与水不同，不许调节移液器；由于蒸汽压高和湿润行为的变化，应快速移液；移液结束后，拆开移液器，让液体挥发	通常对于蒸气压高的液体，任其自然挥发的过程就足够了，或者将下部浸入消毒剂中（确保浸入的液面不要超过密封圈弹簧位置，以避免受到液体腐蚀）。用双蒸水清洗，并用上述干燥方法将其干燥
放射性溶液	为了避免污染，应该使用带有滤芯的吸嘴，或者使用正向置换方法	拆开移液器，将污染部分浸入复合溶液或专用的清洁溶液，用双蒸水清洗，并用上述干燥方法将其干燥
核酸/蛋白质溶液	为了避免污染，应该使用带有滤芯的吸嘴，或者使用正向置换方法	蛋白质：拆开移液仪，用去污剂清洗，清洗和干燥方法如上所述 核酸：在氨基乙酸/盐酸缓冲液（pH2.0）中煮沸10min（确保琼脂糖凝胶电泳检测不到DNA残留），用双蒸水清洗干净，并用上述的干燥方法干燥，同时给活塞涂抹少量润滑油

3. 消毒

包括紫外消毒、高压消毒。若移液器采用抗紫外线的高质量材料做成，可以采用紫外消毒。高压消毒分为整支移液器高压灭菌消毒和半支高压消毒。整支高压灭菌消毒前需旋松连接部位，进行部分拆卸和半支高压消毒；下半支可以拆卸，进行高压消毒

(121℃、20 min)，如有必要，将消毒部件在室温下晾干，等到温度彻底降低后再安装。

4. 拆卸和安装

(1) 拆卸的具体步骤

1) 往下按紧脱卸按钮，用力拉出脱卸套筒。

2) 向左旋转下半支移液器，使其脱离把手。可使用随移液器提供的小工具对下半支进行拆卸。

3) 按活塞固定器并移走（活塞有可能受弹簧弹力作用弹出）。

4) 卸下活塞和弹簧。

(2) 安装的具体步骤

1) 把活塞和弹簧装入移液器下半部。

2) 把活塞固定器放在活塞上面，并把它按进下半部分的沟槽。

3) 把下半部旋紧到上半部手柄（不要使用小工具）。

4) 按下脱卸按钮，装上脱卸筒套。

微量移液器是生物实验室中最常用的实验用具之一，在科研工作中由于其基础性而显得十分重要。该仪器可大大减少操作时间，并保证实验的准确度，因此广泛用于微生物、组织培养和生化实验中。目前，微量移液器的主要发展趋势为精确度越来越高（如电子移液器）、种类越来越多（包括多道移液器、瓶口移液器等）。微量移液器在生物与分子生物学实验中的应用会越来越广泛，可信度会越来越高。

主要参考文献

张维铭. 2003. 现代分子生物学实验手册. 北京：科学出版社. 12～15

第二十一章　自动部分收集器

自动部分收集器可将收集与取样分开进行，即可在收集的过程中只取少量样品（取瞬间样）供分析使用。一般该类仪器备有外控信号接口，收集与取样可由计算机或在线分析信号控制，不仅节约人力，更能提高工作效率及产品质量。目前，该类产品的各种型号与规格可以满足不同种类工作和小型试验或生产的需要。如图 21-1 为常见的部分收集器的外形图。

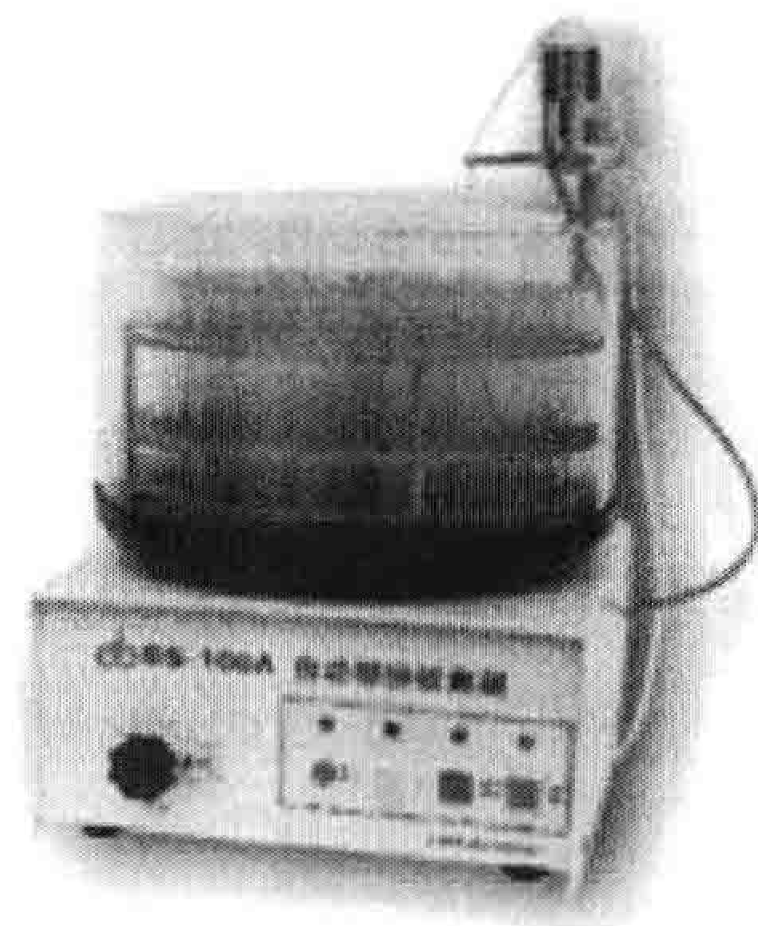


图 21-1　上海青浦沪西仪器厂自动部分收集器 BS－100A

（来自 www.bio-equip.com）

该类仪器操作简单，在吸附和淋洗过程中均能自动完成取样，是从事色谱离子交换工艺过程研究与生产的理想的取样设备，可用于化学、化工、生物、医药、食品等各方面。

第一节　操作使用

一、准备工作

1）先将电源线、试管、竖杆、安全阀、收集盘等按实物安装图连接好，电源线接后面板的电源插座（220V 交流电源），安全阀引出线接后面板安全阀插座。向上拨动电源开关，这时绿灯亮。

2）后面板的计滴器插座、记录仪插座、恒流泵插座分别与相应配套计滴器、记录仪、恒流泵相接。不使用这些配件时，这些插座留空。

3）定位。在面板上旋松时间选择固定螺钉（注意不要过分旋松，防止螺钉脱落），使时间选择指在“0”刻度，换向开关拨向逆或顺时，收集盘就会做逆时针或顺时针方向连续转动，换管臂也相应向内或外移动，待到收集盘停止转动，报警指示灯亮，同时发出报警信号，表示已到内或外终端。然后使时间选择旋钮离开“0”位，换向开关拨向顺或逆，收集盘即向顺或逆时针方向转换一管，此位置是收集的最后或第一管，检查滴管头是否对准内、外终端中，如未对准，可松开换管臂固定螺丝，调节换管臂使其滴管对准试管中心。定好位以后，千万不要再改变换管臂的位置以保证收集盘和换管臂同步旋转，平时不要把时间旋钮放在“0”位。

4）将自动开关拨在关位置，按手动开关，按一下放开一次，指示灯亮一次，收集器相应转换一只试管，检查滴管头是否对准试管中心，如未对准可将试管臂略做调整。连续按手动开关，收集盘连续换管至终端管不动时，报警指示灯亮。

5）将报警板插头插入警控插座内，滴几滴溶液在报警板上，随即发出报警声，说明报警器正常，此时安全阀关闭，恒流泵停止工作。然后擦干报警板，置于滴管口所对准的试管下面。

二、操作步骤

首先按上述方法使收集盘回到外终端第一管，换向开关拨向逆。

1. 手动收集

按动手动开关，人工控制收集时间和换管，按一下放开一次，指示灯亮一次，收集盘即转换一只试管。

2. 自动定时收集

将时间选择旋钮选定在所需要的刻度上，旋紧固定螺钉；开启自动开关，这时自动指示灯亮，即自动定时收集开始，这样每管的收集时间基本相同。注意自动收集期间不要旋动时间选择旋钮，否则要损坏仪器。

三、注意事项

1）使用前应参照准备工作一项，检查各个旋钮，观察仪器是否运转正常。尤其是换管、定位是否正常、准确，每次是否转换一只试管。如每次转换多支试管，一般情况下，可通过重新定位加以纠正，无效时应检查仪器本身是否出故障。

2）要保持收集盘的干燥，防止报警板滴上液体引起不必要的报警。

3）事先要仔细检查收集用的试管大小、高低是否合适，底部有无破损。

四、不同型号仪器的性能特点

以上海青浦沪西仪器厂自动部分收集器 BS－100A 为例。

该仪器在正常工作条件下（0～40℃）能连续工作一周左右。配有安全阀，每当换管或收集完毕指定的管数时，安全阀能自动关闭，以防液体流失。该仪器与恒流泵配套使用，每当换管、指定的管数收集完毕时或仪器发生故障时，恒流泵能自动停止工作。与数字计滴器配套使用，控制范围从 1～999 滴，收集时可以任意选择。该仪器可与紫外检测仪联用，在收集过程中绘出层析图谱。该仪器配有报警系统，当有液体流失时或收集盘转到终点时会自动报警。

第二节　自动部分收集器的发展

新型离子交换自动部分收集器采用集成双定时时间继电器，具有更宽的定时范围，更低的功率消耗，生产成本更低，结构简单，使用与维修方便的特点。

这一新型自动部分收集器利用集成双定时器代替电容充电延时的定时电路及换样驱动电路，使连接电路极为简单，定时准确度大大提高，运行的可靠性也更佳。该仪器由部分收集控制器和样品收集分配器两部分组成，两部分之间用电缆连接。整个电路基本由集成双定时时间继电器、驱动电机和一支微动开关构成。当仪器通电后，定时器开始计时。到达预定时间后，继电器的吸合/释放状态转换，通过置于“常开点”的微动开

关给电动机供电，使之旋转，并拨转齿轮盘，使取样头指向下一个取样位置，继之推压杠杆，使微动开关脱离“常闭点”，切断电动机的电源。随后开始下一个样品收集的计时。

双定时时间继电器可以任意设定两个在1～9999s范围内的时间 t_1 和 t_2，按倒计时并连续、循环（即 t_1—t_2—t_1—t_2…）方式运行。当两个时间设置完毕并启动后，开始运行 t_1；待 t_1 运行结束时，继电器转换工作状态，并继续运行 t_2；当 t_2 运行结束，继电器返回原工作状态，并又继续运行 t_1。该仪器巧妙地利用了双定时时间继电器可以设定两个定时的特点，将 t_1 留给使用者，用于设定样品的收集时间；t_2 则根据收集器所使用的电动机转速，规定为一个固定不变的值，用于电机驱动。一般要求设定的 t_2 可驱动电机转动大约45°。

从离子交换柱中流出的溶液滴入“样品分配头”内，被“分配头”引导至“样品分配板”边缘的锥形槽中，在设定的时间内，通过导管流至放在底座上的量筒里。到达设定时间后，由定时器发出电信号驱动电动机旋转并带动样品分配头转到下一个样品收集位置。收集分配器俯视为圆形。沿圆盘外缘的锥形孔个数决定部分收集样品的个数，一般可以设计为24～36个。考虑到离子交换小型试验通常使用的流速和化学分析对样品数量的一般要求，样品收集容器一般采用50ml量筒，因而沿圆盘外缘的锥形孔的直径大约32mm。根据安排的样品收集个数，分配板的直径大约为30～45cm。

这一型号自动部分收集器简化了电路设计，使样品收集分配器的结构更趋规范合理，达到了加工更方便、工作更稳定可靠、维修更简单、制造成本更低的目标。该仪器很适合小型离子交换过程中的自动取样。如果适当扩大样品分配收集器的尺寸，可直接用于离子交换工业生产的取样要求。

主要参考文献

朱天侠. 1999. W4自动部分收集器简介. 湿法冶金，(3)：65
朱天侠. 2002. W3b型离子交换自动部分收集器的研制. 湿法冶金，(1)：46～48

第二十二章　DNA 合成仪

由于在合成化学技术方面的进展，使得自动 DNA 合成方法更可靠、更经济且相当简单。输入合成仪的 DNA 序列，剩余的工作只是在合成完成后将合成柱取下，进行 DNA 切落、去保护基以及纯化，并进行鉴定和计算合成率。DNA 合成仪能合成长达 200 个核苷酸，每次循环约需 12～15 min，过去需要数周才能合成的寡核苷酸现在只需要几小时就可以完成。DNA 合成仪的发明和完善使得人们从繁重的劳动中逐步得到解脱。目前生产 DNA 自动合成仪的厂家主要有美国应用生物系统（ABI）、美国贝克曼公司（BECKMAN）等几家公司，其中以 ABI 公司的仪器占我国及世界市场份额的 80%～90%。图22-1 为 ABI3900DNA 合成仪外形图。

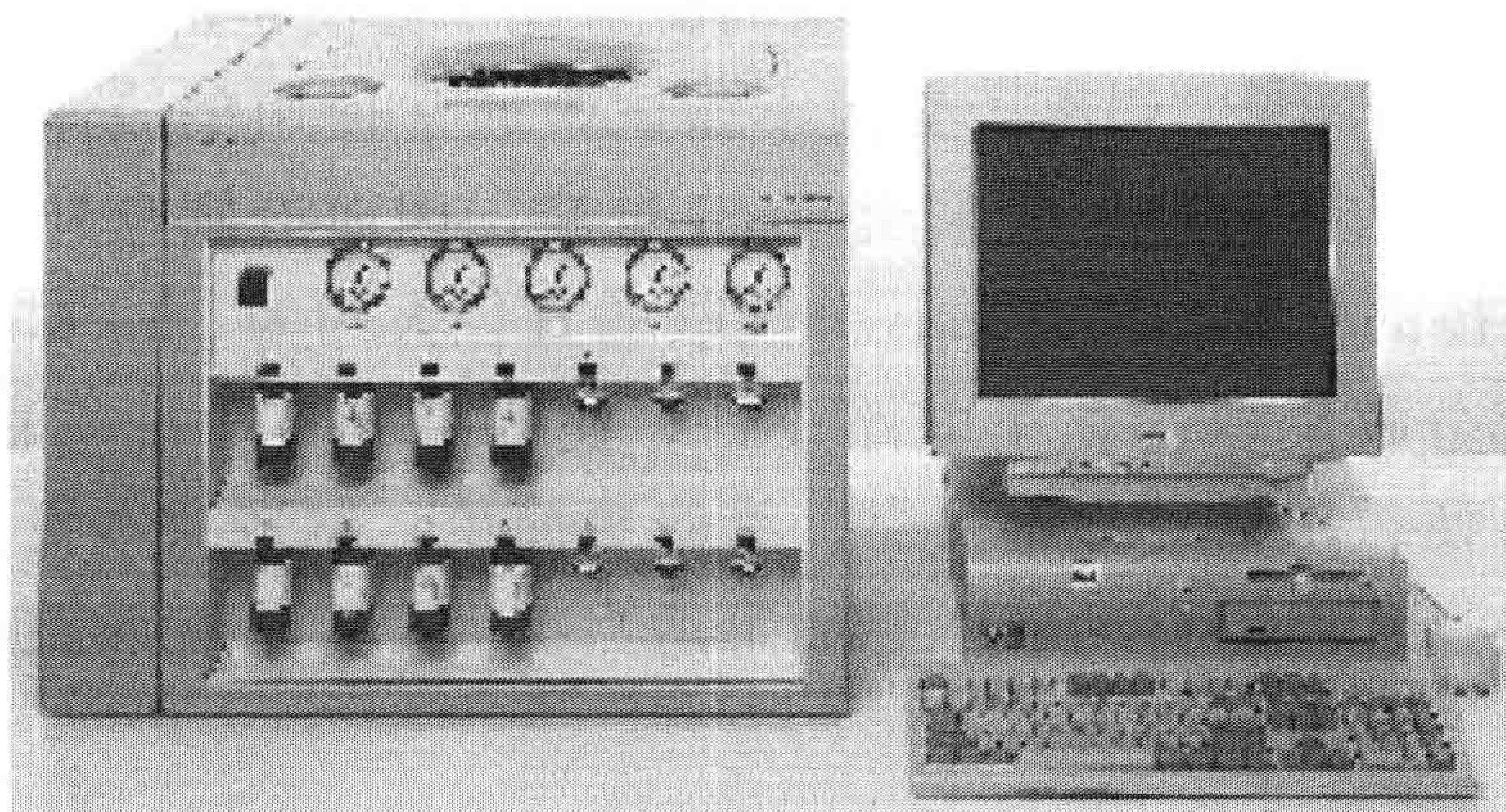


图 22-1　ABI 3900 台式高通量 DNA 合成仪

（来自 www.appliedbiosystems.com.cn）

第一节　基本概念与基本原理

一、基本概念

（一）DNA 合成的亚磷酰胺三酯法

亚磷酰胺三酯法合成 DNA 片段，已被 DNA 合成仪广泛使用，使得合成 DNA 片段成为一件非常简单易行的工作。亚磷酰胺三酯法是将 DNA 固定在固相载体上完成 DNA 链的合成的，合成的方向是由待合成引物的 3′端向 5′端，相邻的核苷酸通过 3′→5′磷酸二酯键连接。

合成的第一步是将预先连接在固相载体上其活性基团被保护的核苷酸与三氯乙酸反应，脱去其 5′-羟基的保护基团 DMT，获得游离的 5′-羟基；第二步，合成 DNA 的原料（亚磷酰胺保护核苷酸单体）与活化剂四氮唑混合，得到反应活性很高的核苷亚磷酸活化中间体（它的 3′端被活化，5′-羟基仍然被 DMT 保护），与溶液中游离的 5′-羟基发生

缩合反应，这个反应时间很快。第三步是带帽反应，缩合反应中可能有的极少数 5′-羟基没有参加反应（合格的合成试剂缩合效率一定会大于 98%，所以未参加反应的少于 2%），合成过程使用乙酸酐和 1-甲基咪唑使这些核苷 5′-羟基反应形成酰，终止其后继续发生反应，这种短片段可以在纯化时分离掉。这步反应同样是快速高效的；第四步，缩合后在氧化剂碘的作用下，亚磷酰形式转变为更稳定的磷酸三酯。经过以上四个步骤，一个脱氧核苷酸被连接到固相载体的核苷酸上。再以三氯乙酸脱去它的 5′-羟基上的保护基团 DMT，重复以上步骤，直到所有要求合成的碱基被接上去。

（二）DNA 合成的磷酰二酯法

磷酸二酯法的基本原理是将两个分别在 5′或 3′端带有适当保护基的脱氧核苷酸连接起来，形成一个带有磷酸二酯键的脱氧二核苷酸。所采用的原料是脱氧核苷酸和脱氧单核苷酸，它们都是多功能团的化合物。因此，为了保证合成反应能够定向地进行，必须将不参加反应的基团用适当的保护基团选择性地保护起来，原则是不论是 5′保护基团还是 3′保护基团，都要能够用适当的方法消除掉。一端脱保护的二核苷酸分子，又能同另一个带 3′保护基团的单核苷酸进行第二次缩合反应，形成一个三核苷酸分子。这样从缩合反应开始，到保护基团的消除，再进行新一轮缩合反应。如此反复进行多次，直到获得所需长度的寡脱氧核苷酸为止。

（三）总产量

假设第一次寡核苷酸偶联步骤（第二管）最后稀释的 DMT（二甲氧基三苯甲基，trityl）的吸收为 X，最后一次偶联（最后一管）最后稀释的 DMT 吸收为 Y，则总产量＝Y/X。

（四）偶联率

利用总产量求出每步产量，每步百分产量被称为偶联率。合成 N mer，测得最后脱 DMT 的吸收为 Y，第二次脱 DMT 的吸收为 X，则每步产量＝$(Y/X)^{\frac{1}{N-1}}$，偶联率＝每步产量×100%。

（五）合成寡核苷酸的分子质量

合成寡核苷酸的分子质量计算公式如下：Mol. wt＝$(251\times nA)+(245\times nT)+(267\times nG)+(230\times nC)+61\times(n-1)+(54\times n)+17\times(n-1)+2$；其中 nA＝DNA 片段中腺嘌呤碱基的数量，n＝碱基总数。nG、nC、nT 分别为 DNA 片段中鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶碱基的数量。$61\times(n-1)$ 代表磷酸基的总分子质量，对于亚磷酰胺为 $78\times(n-1)$；$(54\times n)$ 代表 DNA 含水的分子质量，作一个粗略的方法，大约每个核苷酸含 3 个水分子；$17\times(n-1)$ 代表与磷酸基相连的铵阳离子，如果 DNA 是钠盐，则为 $23\times(n-1)$。

（六）微摩尔消光系数（E254）

$$E254=[(8.8\times nT)+(7.3\times nC)+(11.7\times nG)+(15.4\times nA)]\times 0.9$$

（七）将光密度单位（ODU）转变为毫克数

一般1mg冰冻的寡核苷酸相当于大约25ODU（254nm）。

二、基本原理

DNA合成和纯化系统使DNA合成的4个过程（合成、切除、脱保护及纯化）自动完成，定量、自动地收集DNA产品。这些过程在3种同时运行的模块中完成。

DNA合成所需的全部化学步骤都在合成柱内进行，合成DNA所需要的全部试剂和溶剂都可以通过试剂运输系统供给。在柱子（起始载体结合的核苷是装在一次性的柱子中，该柱子除柱体外还有两个固定过滤板和两个接头，所有部件都是由惰性材料制成）中发生3个化学过程。第一个过程发生在合成模块中。柱中含有3′端核苷，与载体物质共价结合，一次加1个碱基到载体结合的核苷上，DNA链就开始增长，合成的粗寡核苷酸既可带5′-DMT基团，也可不带5′-DMT基团，而纯寡核苷酸的合成必须带5′-DMT基团。在自动生产寡核苷酸的第二个过程中，柱子被切换到切除模块，这里浓的氢氧化铵溶液被输送到柱内，从载体上切除寡核苷酸，然后将氢氧化铵溶液中的DNA产物转移到脱保护模块。第三个过程是脱保护，将含寡核苷酸的溶液在65℃加热1h以达到从寡核苷酸上去除掉保护基团的目的。第四个过程为纯化模块，所希望获得的全长寡核苷酸与失败片段及其他杂质分离。纯化是将混悬在氢氧化铵溶液中脱保护的产物通过原来的柱内的载体来完成。DMT化的全长寡核苷酸在柱内结合到载体上，而脱DMT的失败片段和其他杂质都被冲洗去掉。接着经脱DMT后，用20%的乙腈水溶液将DNA产物从柱上洗脱下来。

已纯化的寡核苷酸应用UV（紫外线）检测系统，在20%的乙腈溶液中进行定量测定，当样品输送到样品收集模块时通过检测器，吸收以光密度单位（ODU）表示，产量则以皮摩尔（pmole）表示。自动合成寡核苷酸是以样品收集模块（module）中收集DNA样品而告完成。

三、影响实验结果的因素

（一）偶联效率对总产量的影响

无论采用何种纯化方法，从一个失败的合成中得到纯的寡核苷酸是不可能的。可以用分光光度法测定495nm的吸光度来准确地计算出合成的偶联效率，这是由于每个循环中末端核苷酸5′-OH的脱保护产生橘黄色吸收，这种颜色产生于DMT阳离子的释放，对测定每一步的偶联效率非常有用。在一个成功的合成中，从一个循环到下一个循环间，由于不完全偶联和未反应链的封闭所引起的颜色强度的下降非常小。偶联效率愈高，产率愈高，一定偶联率下，随着片段的延长，寡聚脱氧核苷酸的每步得率逐步下降。

采用优质的试剂，在设计合理的DNA自动合成仪上平均偶联率可以达到99.5%，且仍有余地增加寡核苷酸合成的偶联率。如果日常平均偶联率可达到99.5%以上，DNA链的合成可超过200个核苷酸。

（二）固相寡核苷酸合成的局限性对总产量的影响

虽然 DNA 合成效率高，但是杂质不可避免地要积累。合成一个 20mer 的寡聚脱氧核苷酸，要包含 100 多个单独的化学步骤，每一步骤都有产生不必要的副反应的可能性。除了不完全的偶联所引起的失败片段的积累，去嘌呤化后的寡核苷酸链切除也可产生截去末端的片段。有时会出现碱基杂环的化学修饰，修饰的寡核苷酸产物可能是诱变剂，在生物学实验中容易引起严重的问题。由于副反应的出现，要得到很高纯度的寡核苷酸，必须应用很好的纯化方法进行纯化。

第二节　组成和性能

一、基本组成结构（以 PE392 型 DNA 合成仪为例）

DNA 合成仪的试剂、溶剂及气体流路都是由一加压试剂输送系统控制的。该系统的组成包括：3 个可调压力源、12（自动分析的 12）或 15（自动分析的 16）个试剂和溶剂储液瓶（取决于仪器有 5 个碱基位置还是 8 个碱基位置）、输送阀、2 根或 4 根柱子、出口的废液瓶以及连接各种部件的输送管路。所有试剂输送系统的内表面都是由惰性材料制成的。

（一）压力系统

系统压力由超纯氩（99.998%）提供。氩气密度高、氧污染少，因此高压氩气常常用来启动真空辅助系统及供给合成仪调节器。进入合成仪的氩气通过 10μm 的颗粒过滤器后送到 3 个压力调节器，调节器将氩气输送到特定的压力阀来增加试剂和溶剂瓶的压力。调节器也将氩气供给柱子和试剂阀体。

（二）试剂和溶剂储液瓶

仪器上每个储液瓶都有特定的位置，储液瓶盖座和仪器上所有号码相对应，仪器上的位置或储液瓶的编号都是 1～8（5 个碱基的仪器为 1～5）、9、10、11、12、14、15、18 和 19（配有自动分析的仪器）。将 1～8 号瓶向上推，在聚四氟乙烯插塞周围有一“O”形环，每一瓶颈内部形成一气密塞。因为试剂输送系统是要加压的，所以要使瓶子与仪器之间的密封塞保持气密性。选择合适的一次性塞及在瓶上加“O”形环可以加强气密性。

（三）压力管路及输送管路

每个瓶子都有一个氩气压力管道及输送管道进入瓶盖插塞，对于亚磷酰胺，1～8 号瓶其压力管道也作为排气管。氩气管要保持在液体水平以上，而输送管却伸到瓶的底部。当阀门正确设置打开时，储液瓶上部空间由氩气加压，液体被推进输送管，流到其目的地。

（四）亚磷酰胺瓶排气

除了加压外，亚磷酰胺瓶都是用压力排气管排气的。把亚磷酰胺放入仪器前，要用氩气排除空气使其净化。净化是通过输送管输送气体，当气体输送到瓶内时，空气经压力排气管排出。这是由瓶子更换步骤自动完成的。废液瓶是输送系统的低压侧，必须将出口与大气相通。要确保排气管通到通风柜。如果排气管阻塞，将会产生反压，试剂和溶剂的输送会受到抑制。

（五）输送阀块

试剂输送系统包括两个试剂阀块（8 碱基仪器有 3 个）及 2 个或 4 个柱阀块。阀块控制气体和化学试剂流入柱子及出口。除亚磷酰胺和四唑以外，试剂和溶剂都被同时输送到所有活化柱。当有多个活化柱时，对流速的细微变化，以自动调节每个柱子的输送次数来补偿。每一个 5-端口柱阀块将流出物导入废液口、DMT 收集口，或 DNA 收集瓶，它也控制用于除去或冲洗柱内和柱阀块内的试剂的氩气。

（六）辅助真空

对于阀块的适当运行，关键是隔膜形成一个圆顶小空隙，每次电磁阀打开时，抽气泵为每个阀块提供了辅助真空，辅助真空在隔膜的螺线管一侧形成，使隔膜形成一圆顶空隙。

（七）柱子

起始结合在载体上的核苷酸是装在一次性的柱子中，除柱体外，还有 2 个固定过滤板和 2 个接头，所有的部件都由惰性材料制成。固定过滤板是多孔性聚苯乙烯固定在两端盖子中。入口和出口都是母路厄氏（luer）接头，与仪器的公路厄氏接头配对。柱子是对称的（没有顶端和底部、前后之分），可以以任何方式与公路厄氏接头相连接。每一个柱子都用颜色编号，表示不同的起始核苷酸，以及有一个唯一的连续顺序号码。正常的流路是从底部进入，通过向上输送液体，使 CPG 颗粒上升并保持悬浮状态。溶剂和试剂的流速已经设置好，能使颗粒适当地混合。

（八）路节流阀

试剂通过底部的 luer 接头，流到柱子，如果没拧上下面的一个 luer 接头，应会在一个圆柱形的玻璃流路节流阀上发现。试剂通过流路节流阀中一个很小的通道流到柱子。小量的试剂可以在流路节流阀中结晶，长期这样会造成流路阻塞。

（九）废液和排气

大多数化学试剂输送的最终点是废液瓶，废液瓶是一个空立着的 10L 的聚苯乙烯容器，可放在合成仪附近的地板上或放在低于仪器的附近工作台上。排气管将废气导入适当的排气装置，如排烟罩。

(十) 电导池

电导流动池是为了测定在每个 DNA 合成循环内释放的 DMT 阳离子的总电导而设计的。流动池是由一空隙隔开的两个电极组成，在空隙之间应用一小电压。DMT 阳离子流过电导池时起电导作用。

(十一) 电池

DNA 合成仪一般带有锂电池，可以使用几年。当主电源断开时，所有的合成参数都被保留下来。这些参数包括储存的 DNA 序列，用户设定的循环、步骤和功能，以及瓶子使用资料等。如果正在合成中电源出现故障，合成将被中断，只有主电源恢复时合成才可重新开始。电池还保持合成仪内部的时钟计时。

(十二) 控制器

控制器指导和初始合成仪的所有活动，它的主要部分是软件、微处理机、显示屏幕、键板及相关的电子部件。软件控制合成的所有必要操作并由微处理机来解释和执行。软件储存在一个可取出的存储卡中，这个存储卡插在仪器的背面。合成信息显示在液晶显示屏上，通过选择键板上的键可与仪器交流。软件是“菜单驱动”，通过按适当的键，可选择一项，给予指令。为了完成自动合成，软件应用一个包含一系列步骤的循环来完成全部化学反应。

二、不同型号仪器特点与性能简介

(一) PE 公司 391 型 DNA/RNA 合成仪

美国 PE 公司应用生物系统部（原美国应用生物系统公司，ABI）于 1982 年推出了世界上第一台全自动 DNA 合成仪。391 型 DNA/RNA 合成仪可满足不同科研工作者对高产率、高纯度 DNA、RNA 的需求。该仪器采用固相亚磷酰胺合成法，配有多种规格合成柱，可满合成大量的长片段 DNA；合成试剂纯度＞99.8%；每步偶联效率＞98.5%，保证一般情况下可合成 100bp 以上核酸片段，而且合成的片段纯度高、产率高；每步循环时间 5～6min，合成时间短；可以合成混合引物或探针，即保证在引物某一位点各种碱基有同等掺入率；引物可使用寡聚核苷酸纯化柱纯化；采用快速脱保护试剂，可在 1h 内完成碱基脱保护。

(二) 美国贝克曼公司 Oligo 1000 系列 DNA 合成仪

Oligo 1000 系列采用星型射流设计，可节省试剂用量达 50%；可自由选择 30、200 和 1000nmol 合成量；每个循环只需 2min，裂解/脱保护步骤所需时间短，可在 1h 内合成约 17 个碱基的引物；碱基试剂采用防潮双元包装，能迅速无误稀释核苷酸，具有良好的偶联效率；仪器配有自动监控系统，保证 DNA 准确合成；合成产物纯度较高，无需纯化，可直接应用于大多数的研究。

第三节 使用方法

一、仪器的操作步骤

(一) ABI 391DNA 合成仪

以亚磷酰胺寡核苷酸合成为例介绍该类仪器的一般操作步骤。亚磷酰胺 DNA 合成的试剂有：保护碱基的 5′-DMT，A、G、C、T 亚磷酰胺单体，四唑偶联催化剂，乙酐，*N*-甲基咪唑封闭试剂，三氯乙酸（TCA）脱保护溶液，I2 氧化混合物，乙腈清洗溶剂，氨水切除溶液。使用步骤如下：

1）仔细检查合成仪上所有试剂瓶中的试剂量，必要时换掉试剂瓶，特别注意乙腈的量，因为该溶剂用量较大。

2）将标记好的清洁的收集瓶装在合成仪上。

3）将要合成的 DNA 序列输入合成仪。

4）检查选择的合成步骤是否正确。

5）选择结束方法：Trityl Off Auto 是仪器的原始状态，若打算以 5′-DMT 基团连接纯化寡核苷酸，将其转变为 Trityl On Auto 结束状态。

6）选择结束方法，一般为系统的原始状态。

7）在每个柱监视器的 User name 下，输入你所希望的保存名字。

8）以代码代替相应的 DNA 序列标记每一个收集瓶。

9）打印出每一个柱设置的详细资料。

10）检查打印出来的资料是否正确。

11）运行 Start Column 步骤检查每一个柱的位置，确保合成仪上合成柱处于正确的位置。

12）检查连接在合成仪上的溶剂残留（废液瓶）是否充满。

13）如果分部收集器用来收集每个 DMT 脱保护步骤的流出物，确保试管充分清洁干净，并打开分部收集器，确保 DMT 废液管路通向分部收集器。

14）启动循环，运行开始程序清洗试剂管路，除去原来的试剂。

注意：Trityl On Auto 表示在合成寡核苷酸的 5′端核苷酸带有一个 DMT，并将其从固相载体上切下来，储存在收集瓶中；Trityl Off Auto 表示在合成寡核苷酸的 5′端核苷酸没有保护基团，将其从固相载体上切下来，储存在收集瓶中；Trityl On Manual 表示合成寡核苷酸的 5′端核苷酸带有一个 DMT，寡核苷酸没有从固相载体上切下来，而是保留在合成柱中；Trityl Off Manual 表示在合成寡核苷酸的 5′端核苷酸没有保护基团，寡核苷酸没有从固相载体上切下来，而是保留在合成柱中。

(二) 寡核苷酸切除和脱保护

寡核苷酸 3′-OH 和琥珀酰连接臂之间的酯键的切除在全自动合成仪上是自动进行的，但也可以按照下列方法手工完成，全部操作都在通风柜内进行。所需材料为：浓氨

水溶液，带螺盖的小瓶（5ml），1.0ml气密性注射器，旋转蒸发器或快速真空干燥器。具体操作步骤如下：

1）合成后，用氩气干燥合成柱。

2）干燥合成柱后，从仪器上将其取下。用1ml浓氨水溶液充满注射器并将注射器接到柱的一端。将柱的另一端装上一 luer 接头和一针头，将氨水溶液注入柱中，直到第一滴冒出针尖。此时，柱子内的固相载体应该完全浸泡在氨水溶液中。

3）将针插入橡皮塞中使注射器密封，在室温下放置1h。

4）取下注射器针上的橡皮塞，将氨水溶液通过柱子压入螺盖的小瓶中，暂时拧上盖子，重复步骤1～4次。最后拧紧有3次氨水洗涤液的小瓶子。

5）要完成碱基脱保护，将样品在55℃下过夜。小瓶冷却到室温，取下盖子，全部脱保护的寡核苷酸转移到50ml的圆底烧瓶中，蒸发至干，为进一步纯化备用。

（三）寡核苷酸的纯化方法

纯化过程在DNA全自动合成仪上是自动进行的，但也有以下几种手工方法可以选择。

1. NAP柱纯化

由Pharmacia公司生产，主要成分为Sephadex G-25，经特殊处理后装成不同体积的小柱，常用的有NAP-10。含寡核苷酸片段的氨水溶液，调整体积为1ml加样于NAP-10柱上（使用前以15ml双蒸水平衡柱子）以1ml双蒸水洗脱，收集洗脱下的液体，即为纯化的寡核苷酸，NAP-10柱可以纯化长度在10mer以上的寡核苷酸，产率在90%以上。经NAP-10柱纯化后样品中盐的含量少于3%，完全可以满足实验的需要。

2. 丙烯酰胺凝胶电泳纯化

从合成柱上洗脱的寡核苷酸片段，冰冻、干燥、去氨水，溶于适量水中后，点样于15%～20%丙烯酰胺凝胶制备胶上，按10V/cm条件电泳，过夜。电泳完毕后，取下凝胶于EB染色后观察，或直接将含寡核苷酸片段的凝胶置于硅胶荧光板上（CMC板）紫外线灯下，根据分子质量的标准切下所需的区段（呈黑色），将胶块置于少量缓冲液（10mmol/L Tris-HCl，pH8.0，1mmol/L EDTA，300mmol/L NaCl）中，捣碎胶块，25～42℃浸泡过夜（4～24h），或将胶块置于有少量缓冲液的透析袋中，通电情况下，寡核苷酸片段即进入透析袋中。洗脱的寡苷酸核片段以乙醇沉淀、洗涤，真空抽干后即可应用。

（四）改变自动DNA合成仪上化学合成方法后清洗试剂管道步骤

当从一种类型的化学合成方法改变为另一种类型后，清洗自动DNA合成仪上的所有管道是非常重要的。否则就会导致DNA合成失败。具体方法如下：

1）按照正常方法更换所有必要的试剂。

2）将用过的合成柱装在合成仪上每个柱的位置。

3）在每一柱位置都输入合成片段AGCTT序列。

4）根据合成方法按照 Trityl On Manual 结束方法进行合成。

5）在假合成结束后，弃去旧合成柱，开始寡核苷酸合成。

二、操作要点

1. 合成开始后检查要点

合成开始时，检查第二个核苷酸脱 DMT 所产生的橘色，保证一切正常。第一个 DMT 的颜色不能作为提供资料的依据，因为它是载体上装进的第一个核苷的量度。检查合成柱是否渗漏，渗漏原因可能是由于柱子错误或柱子与合成仪上的 luer 接头未拧紧所致。检查监视器上的详细内容，必要时重新存储所需参数。

2. 自动 DNA 合成仪上试剂的稳定性

无论合成进行到什么程度，试剂管道中的单体每几分钟就需要补充一次，不会出现严重的亚磷酰胺分解。但是如果仪器已经 1h 以上未运行，在合成开始前必须清洗试剂管路，除去管内分解的试剂。即使在最好的条件下，试剂的寿命也是有限的，因此，要将在合成仪上存放 2 周以上的试剂弃去；对于合成 30 个碱基以上的寡核苷酸，应用的亚磷酰胺和四唑在合成仪上的时间应短于一周。对于合成 50mer 或更长的寡核苷酸，应该用新鲜的亚磷酰胺、四唑和乙腈。

3. 自动 DNA 合成仪上的试剂更换

在某一合成期间任何一种试剂用完都会导致合成失败，所以在合成前必须检查所有储液瓶内的试剂量。如果实验室内温度降至 18℃以下，需要用电吹风温热储液瓶，使某些结晶溶解。如果一个位置配有一个一次性的瓶塞，当新瓶子放到合成仪上时，要检查并更换瓶塞。任何裂开的瓶塞都不能使用，永久性的瓶塞也要检查。另外，要检查试剂瓶口边缘是否有缺口，缺口瓶在合成仪上塞不紧，不能输送试剂。

4. 合成中更换试剂瓶

在特定循环上单体缩合、封闭、氧化完成后，等待用乙腈清洗，并中断循环和三个柱。然后按正常方法换瓶，取消所有中断信息，重新开始合成，千万不要让合成中断超过 1min，这样会使偶联率下降或造成合成失败。

三、仪器的故障排除

化学合成方法与生物化学方法之间有着显著的差别，材料和方法上非常小的改变常常会在所获得的产物以及保证可靠的合成路线之间造成差别。下面介绍几个最可能引起故障的经验问题。

1. 溶剂

大多数用在化学合成中的商品试剂都不够纯。因此使用前应该进行纯化（常用方

法：蒸馏）。对于“专为合成DNA纯度”的溶剂也要检查其颜色（几乎所有的液体都是无色的）及透明度（颗粒将阻塞多孔玻璃，分子筛尘埃将造成合成失败）。大多数有关的杂质是水、酸、碱和金属离子。

水：对吸收水的化学试剂蒸馏一次，大多数溶剂的水分将会减少到10μg/g或更少。因为在偶联步骤中允许少量水的存在，故这种水分含量的溶剂可用于合成。许多溶剂都是吸潮的，因此所有溶剂的容器都应该塞紧，只能短时打开，通常没有必要在氩气中储存。

酸和碱：氯化的碳氢化合物常含有微量盐酸，在合成期间会使二甲氧基三苯甲基损失。通过下列方法可以进行检测：在5ml溶剂中溶解1mg的5′-*O*-二甲氧基三苯甲基脱氧核糖核苷酸衍生物，测定495nm处的吸收值，应该没有吸收。极性溶剂中的一级和二级氨能切断寡核苷酸与载体之间的键，可以用茚三酮试验检测。

金属离子：虽然溶剂中没有这一问题，但作为干燥剂的分子筛含有大量的铁。有些溶剂从分子筛中滤出三价铁离子，这种分子筛与DNA键合，引起碱基修饰和核苷酸间的切除。其他金属离子可能也是有害的。

2. 试剂

DNA合成时，脱氧核糖核苷单体中小量的高反应活性的杂质造成的影响非常大。应用大量过量单体，扩大了杂质的影响。检测比较困难，但应该引起高度注意。在催化剂、偶联剂和脱保护剂中的杂质一般影响较小。

3. 仪器

DNA合成可以用很多不同类型的仪器进行，总的原则是既能应用于磷酰二酯法，也可用于亚磷酰胺三酯法。仪器一般分为4种类型：手动、半手动、半自动化和自动化（DNA合成仪）。DNA合成仪减少了合成所需的手工劳动，但是仪器并不能取代人，机器的错误是随着仪器本身的检察能力而变化的。甚至高级的仪器都还没有能够准确地分析一个合成的成功与否或者根据提供的信息作调整的“反馈控制”。因此仪器并不是真正的“自动”（注意：测量释放的DMT基团仅仅是一种机械的检查，对可获得的产物量不是可靠的指导，只是对链扩增的效率有指导作用）。总之，无论选择哪种类型的仪器，接触溶剂的部分最好选用玻璃或是聚四氟乙烯材料。

四、日常维护

1. 瓶塞“O”形环

一月检查一次“O”形环，最少1年更换1次。将新的备用“O”形环与仪器上的相比较，如果在“O”形环上出现白色沉淀，用棉花蘸取乙腈，进行清洗。更换“O”形环的步骤如下：用止血钳夹住“O”形环，从槽中取下（或用牙签钩下），注意不要损坏托住“O”形环的白色聚氟乙烯插塞（teflon insert）；确保插塞上没有颗粒后，用手指将新“O”形环推进槽，进行压力实验。

2. 储液瓶

瓶子都要放在亚磷酰胺及储液瓶位置上，并保持氩气压力以及管路清洁。

3. 流路节流阀

为了防止阻塞，节流阀应该1个月清洗1次，清洗时，先在水中煮沸15min，然后再在甲醇中超声波清洗。

第四节　在生物学中的应用

DNA合成仪在分子生物学领域中的应用非常广泛，大体可以概括为以下几个方面。

1. 合成PCR引物，DNA测序引物和杂交探针

2. 合成生物素标记的DNA包括生物素标记的引物

用于DNA固相测序法（solid-phase sequencing），采用生物素标记的引物进行PCR扩增，再用抗生物素蛋白钓出扩增产物，由于抗生物素蛋白与磁珠共价结合，所以用磁铁吸附即可钓出扩增产物，大大简化了DNA测序模板的纯化步骤。此外，生物素标记的探针用于非放射性杂交检测。DNA合成仪可用于合成生物素标记的探针和引物。

3. 合成荧光素标记的DNA包括荧光素标记的引物

可在合成的DNA片段5′端标记几种不同颜色荧光素（6-FAM、TET、HEX），用于全自动DNA测序仪，还可用于PCR片段大小分析及定量分析，即基因组型分析和基因表达水平的研究。此外荧光素标记的探针用于原位PCR杂交检测，进行基因在染色体上的定位。而荧光素标记的DNA包括荧光素标记的引物皆可采用DNA合成仪进行合成。

4. 合成反义核酸

反义核酸可用于反义调控和基因治疗。反义调控指在体外合成与靶序列互补的DNA片段，转化细胞后与靶序列结合，即在转录水平上抑制基因表达，但由于细胞内存在限制酶系统会把外源核酸降解，所以反义核酸要经硫化修饰后再转化细胞。另外癌症、艾滋病等也可采用反义核酸进行基因水平的治疗。DNA合成仪是合成反义核酸最好的仪器。

5. 合成磷酸标记的DNA

用DNA连接酶把合成的磷酸标记的DNA片段连接起来，在体外进行基因构建。磷酸标记的DNA常用DNA合成仪来合成。

6. 合成RNA

用DNA合成仪合成的RNA主要用于核酶研究，核酶可作为生物导弹转化到细胞

中，定点切割有病基因，如癌基因等。

第五节　DNA 合成仪的发展

当前 DNA 合成仪的主要生产厂商都致力于机器性能的完善和应用领域的开拓以及高效率、高产率的仪器的开发与研究。台湾科学委员会“基因医药卫生科技尖端研究计划”中的基因生物技术组已经成功研发全世界第一台高密度复制 DNA 合成仪，可以同时合成 384 条不同 DNA，每日可合成 768 条 DNA，并可以配合聚合酶连锁反应装置，大量复制各种基因，不但节省时间，也可节省大量人力，这部机器能复制动物、人体、植物的基因甚至是防伪基因。

由于人们所需要的大部分核酸的碱基对数量远远超过目前 DNA 合成仪可以合成的最长核酸链的碱基对数量，因此还需要不断改善合成工艺才能得到较长的核酸分子。为了能够在将来改变酶的结构，使其在工业上更有价值；改变蛋白质和多肽的结构，制备新药物；并开拓有关人类疾病和遗传调控的新领域，化学合成 DNA 在这一过程中将起关键性作用。根据不同化学方法研制的 DNA 合成仪也将不断涌现，能够突破现有核酸合成的碱基对数量限制，大量节省人力、物力、财力。

主要参考文献

李生斌. 2000. 人类 DNA 遗传标记. 北京：人民卫生出版社. 105
马建岗. 2001. 基因工程学原理. 西安：西安交通大学出版社. 57～58
Edge R W，夏令伟. 1998. 核酸探针的合成、标记及使用. 北京：科学出版社. 44～109

第二十三章 自动化多肽合成仪

1963年，R. B. Merrifield建立了将氨基酸的末端固定在不溶性树脂上，然后在树脂上依次缩合氨基酸，延长肽链的固相合成法。在固相合成法中，每一步反应只需简单地洗涤树脂，便可达到纯化目的，克服了经典的液相合成法中每一步产物需纯化的困难，奠定了自动化多肽合成的基础。因此Merrifield获得了1984年的诺贝尔化学奖。到目前为止，固相法已得到很大发展，除了Merrifield当年所建立的Boc（叔丁氧羰基）固相法之外，又发展了Fmoc（芴甲氧羰基）固相法。以这两个方法为基础的各种各样自动化多肽合成仪相继涌现出来，并仍在不断得到改造和完善。图23-1所示为ABI公司433A多肽合成系统。

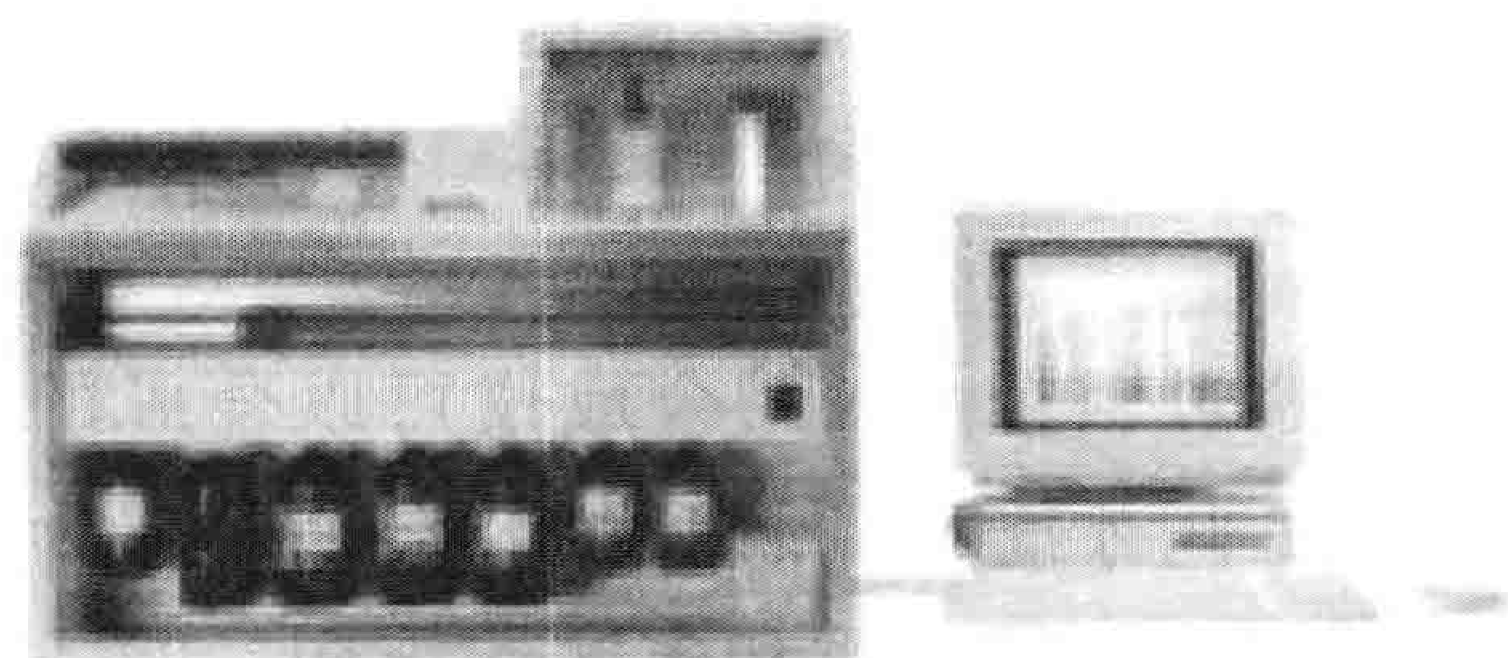


图23-1 ABI公司433A多肽合成系统
（来自www.instrument.com.cn）

第一节 基本概念与基本原理

一、基本概念

（一）α-氨基保护基

常用的氨基保护基可分为烷氧羰基、酰基和烷基三类。其中烷氧羰基保护基可防止消旋化，因此应用广泛。使用最普遍的是Z、Fmoc和Boc。Z基团可用钯黑，5%～20%钯炭催化氢化法脱除。Boc基团具有与Z基团不同的化学性质，不能用催化氢化法脱除，但易于酸解脱除。它可以和Z基团搭配使用，有选择性地脱除。Fmoc基团的特点是对酸稳定，可被碱脱除。因此，尤其适合于合成含有Trp、Met、Cys等对酸不稳定的多肽。此外，Fmoc基团有特征性紫外吸收，易于监测反应的进行，为使用仪器自动化合成多肽带来许多方便。

（二）α-羧基保护基

与氨基保护基相比，羧基保护基种类较少，一般以盐或酯的形式存在。盐是对羧基的临时保护，常用的有钾盐、钠盐、三乙胺盐和三丁胺盐等。常用的酯类有甲酯、乙酯、苄酯和叔丁酯。叔丁酯是近年来最常用的羧基保护基，可用酸在温和条件下脱除。

（三）侧链保护基

为了避免副反应的发生，某些氨基酸的侧链官能团需采用适当的保护基加以保护。

采用哪种保护基要根据合成以及脱保护条件而定。在20种氨基酸中有13种氨基酸侧链具有活泼官能团，在多肽合成时往往需要保护。当然，有些基团是在任何情况下都必须保护的，有些基团则依情况而定。

（四）肽键生成法

在多肽合成中，具有游离羧基的组分被称为羧基组分；具有游离氨基的组分被称为氨基组分。肽键的生成主要涉及羧基的活化，羧基活化的基本原理是将*N*-保护氨基酸或肽的α-羧基转变成活化型的R-COX，使羰基碳原子带有较强的正电性而有利于*R*-NH_2对它进行亲核反应，形成肽键取代基团的电负性越强，对羧基的活化能力也越强。目前常用的肽键缩合法是比较温和的活化酯法、混合酸酐法、叠氮法和缩合剂法。

（五）脱保护基及纯化

合成肽的最终脱保护基不仅决定合成的成败，而且也决定了侧链保护基的选择等合成计划的确立，因此是肽合成中极重要的环节。目前最常用的脱保护基系统是三氟乙酸（TFA）、氢氟酸（HF）、有机磺酸（TFMSA、MSA）和含硅试剂TMSOT、TMSBr。

（六）合成肽的纯化

脱保护基的肽是纯度较低的粗产品，一是因为在合成肽过程中各种副反应、消旋化造成的副反应肽；二是在脱保护基过程中由于保护基残留，肽键的断裂、烷基化、Trp和Met等氨基酸的氧化造成一些副反应产物。因此，根据对目的肽的纯度要求，可采用适当的方法进行纯化。合成肽纯化方法与天然肽纯化方法相同，主要采用凝胶过滤、离子交换层析和反相HPLC等方法。

（七）合成肽纯度鉴定

合成肽的纯度鉴定仅靠一种方法是不可靠的，往往需要综合几种方法所得结果才可判定。常用方法包括：薄层层析（TLC）、氨基酸组成分析（同时用酸水解和酶水解进行，以判定合成肽消旋程度）、等电聚焦电泳、分析HPLC、质谱分析和元素分析等，可根据需要选用几种方法。

二、基本原理

多肽合成是一个重复添加氨基酸的过程，合成一般从C端（羧基端）向N端（氨基端）合成。过去，多肽合成是在溶液中进行，现在多采用固相合成法从而大大地减轻了每步产品提纯的难度。为防止副反应的发生，合成柱与添加的氨基酸的侧链都被保护，羧基端是游离的，且在反应之前必须活化。化学合成方法有两种，即Fmoc法和Boc法。由于Fmoc比Boc有很多优势，现在大多采用Fmoc法合成。

（一）Boc固相法（经典Merrifield固相法）

Boc固相法的氨基保护基采用TFA可脱除的Boc，侧链保护基采用苄醇类。常用

树脂为氯甲基化或羟甲基化聚苯乙烯树脂，目前，广泛采用比氯甲基树脂更加稳定的对乙酰氨基苄酯（PAM）树脂。合成肽酰胺时采用二苯甲胺型树脂。Boc 保护 α-氨基的氨基酸衍生物共价交联到树脂上，TFA 脱除 Boc，三乙胺中和游离的氨基末端，之后再偶联下一个氨基酸。最终脱保护基多采用 HF 法和 TFMSA 法。用 Boc 固相法已合成了许多生物大分子，如酶、生长因子和人工蛋白质等。

（二）Fmoc 固相法

在 Boc 固相法中反复使用酸处理会带来一些问题，如使肽键断裂和酸催化产生其他副反应等。Boc 固相法尤其不适于合成含有色氨酸等对酸不稳定的肽类。1978 年，Chang、Meienlofer 和 Atherton 等采用 Carpino 报道的 Fmoc 基团作为氨基保护基，成功地合成了多肽。目前，Fmoc 固相法已经得到广泛的应用，并越来越受到人们的重视。与 Boc 法相比，Fmoc 不同之处在于氨基保护基采用碱性可脱除的 Fmoc 基，侧链保护基采用 TFA 可脱除的叔丁基。树脂采用 91%TFA 可切断的对烷氧苄醇型树脂和 1%TFA 可切断的二烷氧苄醇型树脂，因此，脱保护避免了强酸处理，用 TFA 或 TMSBr 即可完成。

1. 固相载体

在固相合成中最常用的载体一类是通过 m-二乙烯苯交联的聚苯乙烯树脂。从膨胀性和稳定性角度考虑，交联度为 1%较为合适。另一类常用的载体为聚丙烯酰胺凝胶，它在结构和极性上与肽链相似，因此被认为可能更有利于多肽合成。在多肽自动合成仪中，固相树脂要能够承受连续流动液体造成的一定压力，珠状的凝胶不能达到这个要求。若将珠状凝胶与低密度、高渗透性的无机载体 Kieselguhr 相连则可以解决这个问题。聚丙烯酰胺-Kieselguhr 凝胶已成功地应用于连续流动 Fmoc 固相合成上。

2. 树脂接臂

考虑到与树脂相连的肽的 C 端氨基酸具有不同类型，常常需要在树脂上连接不同支臂以供交联。

3. 第一个氨基酸的连接

第一个氨基酸与树脂支臂通常通过生成酯键来连接，对 *N*，*N*-二甲基氨基吡啶（DMAP）可以有效地催化这一过程，但加入的 DMAP 的量对消旋化有很大影响。此外，还可能使 Fmoc 基团脱落，产生二肽。这些问题可以通过降低温度、缩短连接时间或加入 HOBt 的方法来解决。采用 Fmoc-氨基酸-OTDO 酯或用活化酯法也能得到满意的连接效果。

4. 固相上的接肽反应

主要有活化酯法、混合酸酐法、原位法、酰氯法和缩合剂法等。

5. 监测反应

即使是高效偶联技术，也无法保证酰化反应 100%地进行。当遇到立体障碍或β片层等序列时，偶联反应的效率则会大大下降。在固相合成肽时，尤其是较长的肽的合成时，每一个氨基酸的缩合率应该达到 99.9%，否则得到的产物纯度将非常低。因此监测每一步反应的进行程度显得格外重要，通常采用的监测方法主要有：定性颜色反应（茚三酮法）、定量氨基酸分析、检测部分保护的中间肽的 HPLC 法、在自动化合成肽时的比色法等。

第二节　结构与特点

一、基本组成结构

Merrifield 等 1966 年报道的最初的自动多肽合成仪由 5 个部分组成：氨基酸溶液和选择阀；洗涤溶液、脱保护基试剂、中和试剂、缩合试剂和相应的选择阀；反应容器和振动装置；为洗涤、过滤而设置的送液、加压装置；废液装置。操作通过磁鼓程序控制，根据目的肽的氨基酸排列顺序不同可改变程序。在此之后，反应容器、树脂的振动方式和程序等都在不断改进，目前市场上已经有多种多肽自动合成仪可供购置。

二、不同型号仪器的性能特点

（一）PSSM-8 型全自动多道固相多肽合成仪

该仪器为日常合成多肽机型，采用反应效率高的化学耦合方式，可以合成高纯度的多肽；可在合成抗体/抗原及活性相关的研究中使用；安全、操作性良好，也可进行切树脂副反应少的高效多肽合成；可同时进行 8 道合成相同或不同的高效多肽，每个通道可合成 5～50μmol，满足多肽的使用量，实现日常的和经济的多肽合成（图 23-2）。

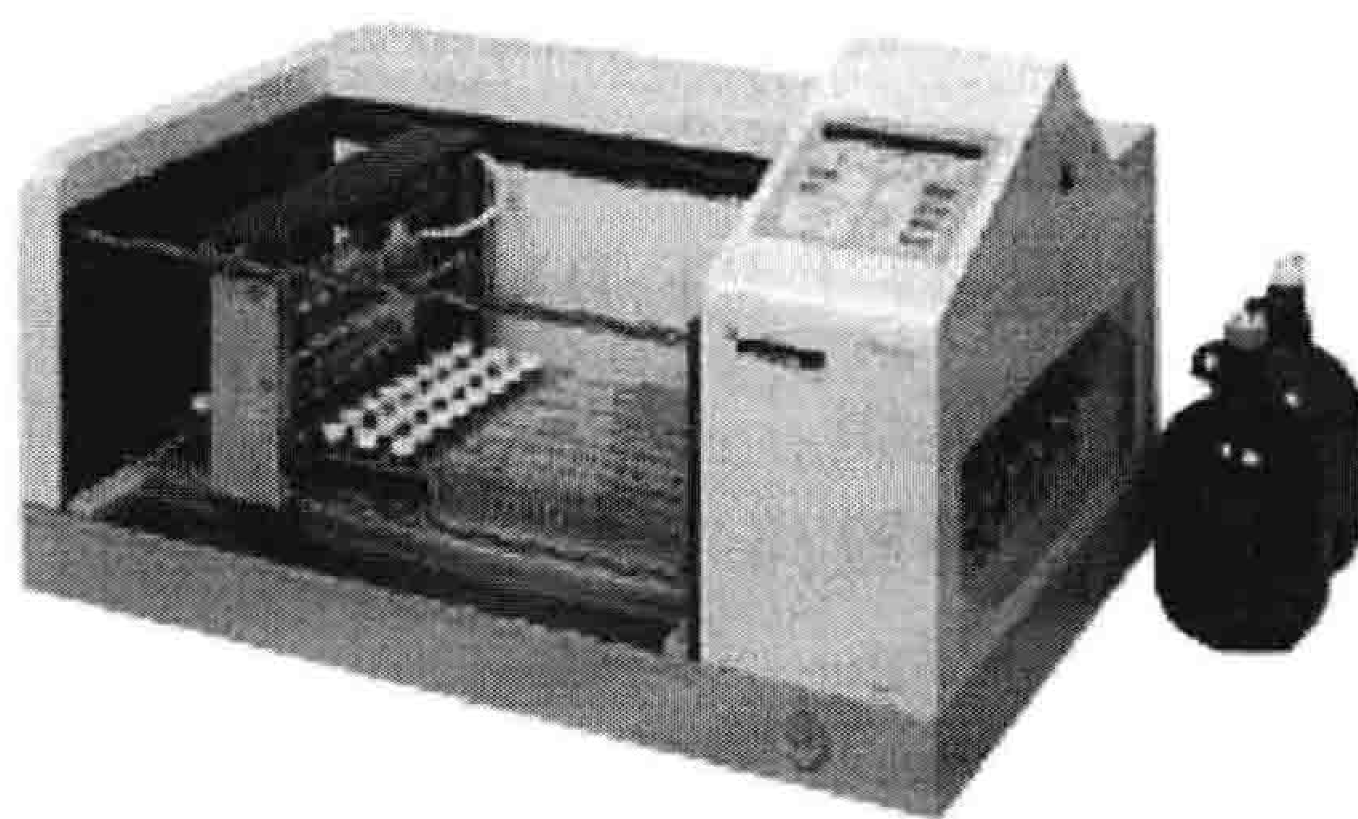


图 23-2　PSSM-8 型全自动多道固相多肽合成仪
（来自 www.21ray.com）

（二）先锋多肽合成仪

先锋多肽合成仪是 Fmoc 连续流式仪器，可用于合成标准和复杂多肽。不同多肽在组成、结构和功能上极为不同。要能合成生物性多肽，需要系统既能灵活处理每一种合成，又能在短时内产出大量多肽。先锋多肽合成仪每个合成可以对规模和活化等条件进行调节。如果两柱不够合成，可增加一或两个多功能分肽合成（MPS）选项来增加产出。

（三）ABI 公司 433A 多肽合成系统

该系统合成规模为 0.1～1.0mmol，可采用 Fmoc 和 Boc 两种方法；特有的涡流混

合式反应腔和NMP溶剂系统可保证活化氨基酸与肽充分反应，偶联率可达99%以上；专利的零死体积阀门设计可去除交叉污染和减少试剂消耗；全套完备的试剂和树脂可供选择；全自动电脑控制，程序编辑快速简便；特有回馈监控功能，自动强化脱保护和偶联，保证高得率。

第三节　操作方法

1. 准备HBTU/HOBt溶液

1）配制0.5mol/L HOBt的DMF溶液：称量13.5g无水HOBt（相对分子质量135.1），置于250ml烧杯中，加入DMF至200ml。

2）配制0.45mol/L HBTU/HOBt溶液：将上述溶液倒入装有37.9g HBTU（0.1mol）的烧杯或烧瓶中。

3）利用磁力搅拌装置搅拌15min，直到HBTU完全溶解。

4）利用漏斗和滤纸对溶液进行过滤。

5）选择合适的容器收集滤液，备用（该溶液室温下稳定期至少为6周）。

2. 氨基基团与生物素结合

1）用DMF洗涤0.1mmol树脂。

2）将0.244g生物素溶解于5ml的DMF-DMSO（体积比1∶1）溶液中，可以适当加热以加速溶解。

3）在上述溶液中加入2.1ml 0.45mol/L HBTU/HOBt溶液和0.3ml DIEA。

4）将活化生物素溶液加入柱子中，旋转过夜。

5）进行二氢茚三酮测试（无色），确认生物素已经与柱子结合。

6）用2×DMF-DMSO（1∶1）溶液洗涤柱子，去除多余的生物素。

7）依次用2×DMF和2×DCM洗涤柱子。

8）肽段脱离之前，柱子要进行干燥。

3. 将Fmoc氨基酸装入2-Chlorotrityl Chloride柱中

1）用反应管道称量10g 2-Chlorotrityl Chloride树脂（15mmol），用2×DMF洗涤后，在50ml的DMF中浸泡10min，排尽管道中的液体。

2）用试管称量10mmol Fmoc氨基酸，用40ml DMF进行溶解，将溶液转移至上述反应管道中，加入8.7ml DIEA（50mmol），室温下涡旋30min。

3）再向反应管道中加入5ml甲醇，涡旋5min。

4）排尽管道后用5×DMF洗涤。

5）检查替代率。

6）加入50ml 20%六氢吡啶，去除Fmoc基团，涡旋30min。

7）依次用 5×DMF 和 2×DCM 洗涤后，将树脂放置于泡沫板上的薄纸上，于室温下干燥过夜。将另一张薄纸覆盖在树脂上，轻轻挤压，以破碎聚集物。

8）对树脂进行称重，并装入合适的容器内备用。

4. 检查含有 Fmoc 氨基酸树脂的替代率

1）用微量离心管称量双份 5～10mg 含 Fmoc 氨基酸树脂样品，加 1.00ml 20%六氢吡啶/DMF，振荡 20min 后，离心使树脂沉降。

2）将 100μl 上清液转移至装有 10ml DMF 的试管中，混合均匀。

3）用移液管分别转移 2ml DMF 到参比杯和样品杯中，将分光光度计调零，利用参比杯调空白后，向样品杯中加入 2ml 步骤 2）中所得溶液，读取光吸收值。

4）利用下列公式进行替代率（Subs）的计算：

$$\text{Subs} = 101(A)/7.8(w)$$

式中：A=光吸收值；w=树脂的质量（mg）。

5）在 301nm 处测试光吸收值 3 次，计算平均替代率。

5. Fmoc 合成（0.25mmol）的步骤

1）用 4×DMF 洗涤树脂后排尽液体。

2）向树脂中加入约 10ml 20%六氢吡啶/DMF，振荡 1min 后排尽。

3）再加入 10ml 20%六氢吡啶/DMF，振荡 30min。

4）排尽液体后再用 4×DMF 洗涤树脂，确保没有六氢吡啶残留。用二氢茚三酮测试进行检验，树脂颗粒应该显蓝色。将 1mmol Fmoc 氨基酸、2.1ml 0.45mol/L HBTU/HOBT（1mmol）、348μl DIEA（2mmol）加入树脂中，振荡不少于 30min。

5）排尽液体后用 4×DMF 洗涤树脂。

6）进行二氢茚三酮测试，若为无色，从步骤 2）开始重新合成；若为蓝色，回到步骤 5）与 Fmoc 氨基酸重新结合，如有需要，可增加这一步的反应时间。

6. 用 Fmoc-磷酰酪氨酸合成含磷酰酪氨酸的肽段

所需试剂：Na-Fmoc-O-磷酰酪氨酸 1g。

1）若用 ABI 多肽合成仪进行 0.1mmol 或 0.25mmol 的合成，使用 0.483g Fmoc-Tyr（PO_3H_2）-OH（1mmol）即可，将 Fmoc-Tyr（PO_3H_2）-OH 装好备用。

2）结合 Fmoc-Tyr（PO_3H_2）-OH 的步骤与其他 Fmoc 氨基酸结合步骤，除了结合时间（见下一步）以外，基本相同（注意：ABI 多肽合成仪利用 HBTU/HOBT 作为催化剂）。

3）需要增加 Fmoc-Tyr（PO_3H_2）-OH 的结合时间。例如，ABI 公司的合成仪 430A 加入了较多步骤，如有必要可以进行过夜反应。

4）完成 Fmoc-Tyr（PO_3H_2）-OH 结合后，进行二氢茚三酮测试，若无色，说明结合完全，若显蓝色，说明尚未完全结合。

5）在磷酰酪氨酸结合后或进行同步结合时，要增加氨基酸残基的反应时间（注意：

在磷酰酪氨酸结合后进行氨基酸残基结合比较困难)。

6) 由于磷酸基团未被保护,很有可能发生侧链反应,因此在磷酰酪氨酸上结合的氨基酸数目是有限制的(注意:磷酰酪氨酸上结合 10 个氨基酸的多肽已经成功合成)。

7. 被保护肽段的脱离

原始树脂:Chlorotrityl 树脂;1g 含肽段树脂所需试剂:1ml 乙酸(AcOH);2ml 三氟乙醇(TFE);7ml 三氯甲烷(DCM)。

1) 准备上述试剂的混合溶液。

2) 将含肽段树脂加入上述溶液中,室温下搅拌 1h。

3) 过滤,并用 2×10ml TFE∶DCM(2∶8)的混合溶液洗涤树脂,确保所有产物复性。

4) 蒸发溶液使得液体体积少于 5ml。

5) 向含有 100μl 上述溶液的试管中加入醚,观察被保护肽段在醚中的溶解性。若有沉淀,进行步骤 6);若没有沉淀,进行步骤 7)。

6) 向步骤 4) 的溶液中加入冷却的醚,使得被保护的肽段完全沉淀。进行过滤可获得多肽产品。

7) 一些被保护的肽段在醚中溶解,这种情况下需要加水使其沉淀,进行过滤即可获得产品。

8. 固相结合的 Fmoc-Lys(Mtt)的 Mtt 基团脱除

所需试剂:Fmoc-Lys(Mtt)-OH 1g

1) 在 DCM 中浸泡树脂使其膨胀。

2) 用 2×3%TFA/DCM 洗涤树脂(由于树脂已经在 DCM 中膨胀,这一步用 3% TFA/DCM 快速洗涤确保了 TFA 的浓度精确为 3%)。

3) 在 3%TFA 中振荡树脂 10min。

4) 重复步骤 3)。

5) 依次用 3×DCM、3×DMF、3×异丙醇、3×DCM 洗涤树脂。

6) 将树脂在空气中干燥。

9. 肽段的 FITC 标记

所需试剂:FITC 1g,Fmoc-Ahx-OH 1g。

1) 在标准结合条件下将 Fmoc-Ahx-OH 与肽段的氨基酸 N 端结合。

2) 用 20%六氢吡啶脱去 Fmoc 基团。

3) 用 3×DMF 或 4×DMF 洗涤树脂。

4) 将树脂浸泡在 DCM 中使其膨胀,而后排尽液体。

5) 配制 FITC 的吡啶/DMF/DCM(12∶5∶7)溶液。向树脂中加入足够的溶液制成悬浮液。注意溶液的用量,因为反应的速率与悬浮液的浓度成正比。

6) 加入步骤 2) 中所得溶液。

7）过夜混合。

8）利用二氢茚三酮反应检测反应是否进行完全。若 FITC 与氨基未完全结合，反应显蓝色，需要重新进行步骤 5)～7)。

9）依次用 2×DMF、2×异丙醇、2×DCM 洗涤树脂。

第四节　在生物学方面的应用

多肽合成仪用于合成各种蛋白质与多肽，进行蛋白质结构、功能以及体外相互作用、免疫学等方面的研究。下面举例说明多肽合成仪的应用。

一、合成汉坦病毒核衣壳蛋白抗原多肽片段

利用多肽合成仪合成汉坦病毒核衣壳蛋白（aa17～66）50 个氨基酸残基的核心序列，以此为抗原，建立了新型的特异性检测抗汉坦病毒 IgG 和 IgM 的酶联免疫方法。该方法特异性强，灵敏度高，简便易行，适合基层医疗单位进行诊断。

二、用于多肽类药物的研制

新的活性肽不断发现对揭开生命奥秘如细胞分化、免疫防御、肿瘤、衰老、生殖、分子进化等以及激素功能有了更深层次的认识。利用多肽合成仪可以快速获取活性最佳的多肽，加速多肽药物开发。

此外，多肽合成仪为组合化学方法的建立奠定了基础，可用于合成肽组合库的合成，为组合化学的发展做出了重大贡献。

第五节　自动化多肽合成仪的发展

固相合成多肽的成功依赖于很多因素，载体是其中最关键的因素。近十几年来，为了改进传统使用载体骨架的非均相性问题，发展了一系列聚苯乙烯固载聚乙二醇树脂载体，这种类型载体有良好的亲水性能，兼具了固相合成与液相合成的优点，提高了缩合反应的速度和产率，是固相法合成多肽的理想载体。目前，这种载体主要用于长肽链和疏水肽的合成，特别是用作连续流动肽合成的载体，其性能与作用是一般聚苯乙烯载体无法替代的。

为了发展新型载体，改进固相合成方法，在过去对 PS-PEG 载体研究的基础上，将酸敏性手臂结构和 PEG 链同时引入聚苯乙烯骨架中，合成了对羟甲基苯氧乙酰胺 PEG 树脂（PS-PEG-HMPA）。运用该树脂进行多肽合成产率较高，纯化后的产物经 HPLC 鉴定，得到多肽单一峰，证明了产物均一性，氨基酸分析的实测值与理论值相同，因此证明 PS-PEG-HMPA 可以作为一种新型酸敏载体使用。

除了对于载体进行工艺改进之外，新型的多肽合成仪也不断涌现。目前 CEM 公司已经推出了世界上第一台微波多肽合成仪，利用微波作为能量输入，使所需合成时间缩短为原来的 1/20～1/10，减少了试剂用量，降低了每一周期的合成成本，提高了产物

的产率及纯度，在多肽合成领域取得了技术上的重要突破。

主要参考文献

李铮，白雪帆，边惠洁. 2001. 汉坦病毒核衣壳蛋白抗原多肽片段的合成与应用. 第四军医大学学报，22：691～695

娄素君，向新，黄海等. 1999. 酸敏性 PEG 载体的合成及其在多肽合成中的应用. 离子交换与吸附，15：15～22

陶慰孙，李惟，姜涌明. 1995. 蛋白质分子基础. 北京：高等教育出版社. 175～187

第七篇　分离分析系统

20 世纪 90 年代末诞生的系统生物学包括基因组学、蛋白质组学、代谢组学和生物信息学，分别通过基因、蛋白质和代谢产物水平上的整体分析来研究和探索生命的现象和本质。针对这些复杂的生物体系，首先要解决的重大问题是生物系统物质的分离分析。

分离纯化生物大分子的方法很多，主要是利用其特异性的差异，如分子大小、形状、酸碱性、溶解度、极性、电荷和对其他分子的亲和性等。其中一种重要的思想就是将混合物置于单一的物相中，通过物理力场的作用使各组分分配于不同区域而达到分离的目的，如离心、超滤、电泳等。分离出生物大分子后，需要对其进行分析，确定生物学特性、化学组成、物质含量、结构与功能的关系等，这一过程目前也已经可以通过一些大型仪器来完成。本篇将详细介绍生物化学与分子生物学领域的常用分离仪器：毛细管电泳仪、离心机和 HPLC，同时还将介绍几种大型分析仪器：蛋白质测序仪、DNA 测序仪和生化分析仪。

第二十四章　毛细管电泳仪

电泳是电介质中带电粒子在电场作用下以不同的速度向电荷相反方向迁移的现象，利用这种现象对化学或生物化学组分进行分离分析的技术称之为电泳技术。但传统电泳因分离物易受干扰而发生扩散，需以纸、纤维素、凝胶等作为载体，不能在缓冲液中自由进行，存在着致命的局限性，即产生难以克服的由两端高电压引起的电解质离子流的自热，或称焦耳热（Joule heating）。因为焦耳热会引起从载板中心到两侧或管内部径向的黏度和速度梯度，从而导致谱带展宽，效率降低，因此极大地限制了高电压的使用。1974 年，芬兰的 Virtanen 提出用 200～500μm 内径玻璃管进行毛细管电泳（capillary electrophoresis，CE）分离，但效率不高；1981 年和 1983 年，Jorgenson 和 Lukacs 提出并使用了更细的毛细管（内径 75μm），以荧光检测进行试验，获得高效分离（塔板数达 4×10^5），并初步讨论了分离机制，创立了现代毛细管电泳，引起广泛关注，被称为毛细管电泳发展的里程碑。1984 年，日本的寺部等引入了毛细管电泳的一个重要分支，即以组分特别是中性粒子在毛细管内的胶束和缓冲液之间的分配为基础的胶束电动毛细管电泳（MECC 或 MEKC)；1987 年，H. Jerten 把传统的等电聚焦过程移到了毛细管内，提出了毛细管等电聚焦（CIF)；同年，Cohen 和 Karger 等提出了毛细管凝胶电泳（CGE)，这是效率最高的分离方法。到 1988 年，出现了第一批毛细管电泳商品仪器。目前已有许多实验室开始了这方面的研究工作，并开始了该技术在种子储藏蛋白、药物分析方面的应用研究。同时，数家单位都研制推出了价格低、性能适中的毛细管电泳仪器。

由于毛细管具有良好的散热效能，允许在毛细管两端加上高至 30kV 的高电压，分离毛细管的纵向电场强度可达到 400V/cm 以上，因而分离操作可以在很短的时间内（多数小于 30min，最快可在几秒钟）完成，达到非常高的分离效率（理论塔板数达到 400 000/m 以上，最高达 10^7/m 数量级)。因为毛细管内径很小（一般小于 100nm)，对内径 50μm，长度为 50cm 的毛细管，其容积不足 1μl，进样体积在纳升级，样品浓度可低于 4～10mol/L。因此，毛细管电泳仪达到了仪器分析技术所要求的高效、快速、样品用量少等最基本和最优异的特点。此外，毛细管电泳仪还具有自动化、操作简便、溶剂消耗少、环境污染小等优点。

近年来，毛细管电泳的发展极其迅速，涉及的电泳技术有很多种，通常按照电泳实验条件中的某一特征来命名。若按照电泳所使用的载体命名，可分为自由溶液电泳、琼脂电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、滤纸电泳等；若以电泳支持物的形状或位置命名，则分为 U 形电泳、柱状电泳、板状电泳等；按照原理命名有等电聚焦电泳、等速电泳、免疫电泳等。本章主要讨论的毛细管电泳（CE)。泛指在极细的毛细管内实现的一大类电泳技术。

第一节 基本概念与基本原理

一、基本概念

（一）耦电层和 zeta 电势

耦电层是浸没在液体中所有表面都具备的一种特性，通常是指两相之间的分离表面由相对固定和游离的两部分离子组成的与表面电荷异号的离子层。在毛细管电泳中，不论是带电粒子的表面还是毛细管管壁的表面都有耦电层。

在电介质中的任何带电粒子都可被看成是一个耦电层系统的一部分，在这个系统中，粒子自身的电荷被异号的带电离子中和，这些异号离子中有一些被不可逆地吸附到粒子上，而另一些则游离在附近，并扩散到电介质中进行离子交换。被吸附的“固定”离子有一个切平面，它和离得最近的游离离子之间的电势被称之为粒子的 zeta 电势。

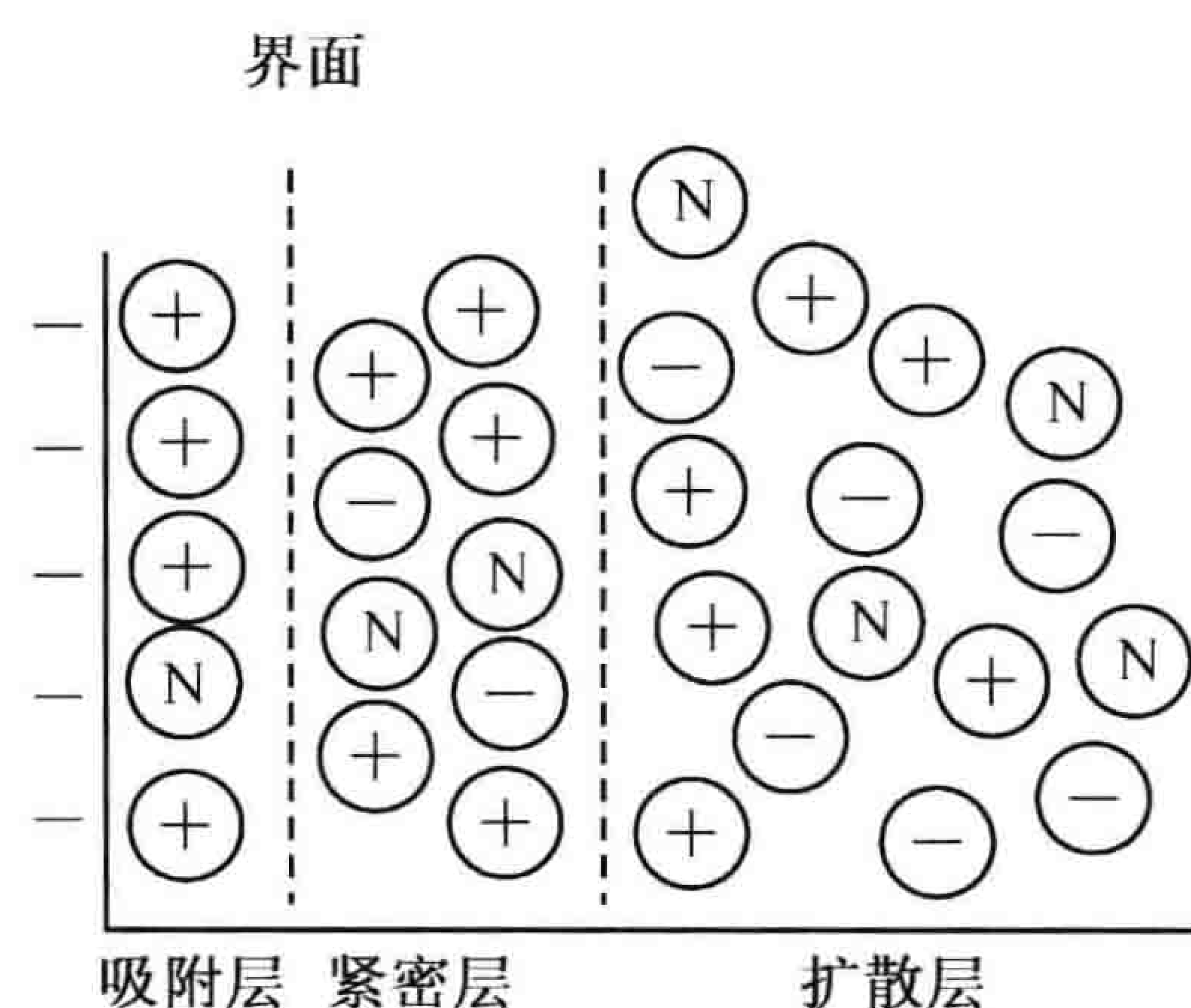


图 24-1 耦电层示意图

另一种情况发生在管子表面，毛细管电泳通常采用的是石英毛细管柱，因此，典型的情况是在硅胶表面。在一般情况下（pH＞3.0），硅胶表面带负电，当其和溶液接触时，在溶液中也会形成紧贴硅胶表面的和游离的两部分离子。由这两部分离子组成的与表面电荷异号的离子层，称为耦电层，严格地讲，其中的第一部分又被称为 stern 层，如图 24-1 所示。游离部分离子的电荷密度随着与表面距离的增大而急剧减小。在 stern 层和耦电层的游离部分的起点的边界层之间的电势称之为管壁的 zeta 电势，典型值大约在 0～100mV。zeta 电势的值随距离增大按指数衰减，使其衰减一个指数单位所需的距离称之为耦电层的厚度，记为 δ。电泳作为带电粒子在电介质溶液中的定向流动，其过程要比电子流通过金属复杂得多。

（二）电泳

在半导电流体中，荷电粒子在外电场作用下的泳动现象称为电泳（electrophoresis）。电泳的基本概念相对简单，当一荷电粒子置于电场中时，它受到一个正比于它的有效电荷（q）和电场强度（E）的力（F）的作用。

$$F = qE$$

在电场作用下荷电粒子以速度（v）做平移运动，与此同时它又受到一个与其速度成正比的黏滞阻力（F'）的作用，即

$$F' = fv$$

式中：f 为比例常数，称为平动摩擦系数，与粒子大小和形状有关。当这两个作用力相对平衡时，$F = F'$，粒子以稳定速度（v'）运动，于是

$$v' = qE/f$$

对球形粒子，f 由 Strokes 定律给出：

$$f = 6\pi\eta r$$

式中：η 为介质黏度，r 为表观液体动力学半径，因而上式可以写为

$$v' = qE/6\pi\eta r$$

又由于 $\zeta = q/\varepsilon r$，用荷电粒子的 zeta 电势来表示，上式成为

$$v' = \frac{\varepsilon\zeta_e}{6\pi\eta}E$$

对于棒状粒子

$$v' = \frac{\varepsilon\zeta_e}{4\pi\eta}E$$

由此可见，荷电粒子在电场中的迁移速度，除了与电场强度和介质特性有关外，还与粒子的有效电荷及其大小和形状有关。因此，粒子的大小与形状，以及其有效电荷的差异，就构成电泳分离的基础。

因为电泳速度与外加电场强度有关，所以在电泳中常用淌度（mobility，μ）而不用速度来描述荷电粒子的电泳行为与特征，电泳淌度（μ_{ep}）的定义为单位场强下离子的平均电泳速度，即

$$\mu_{ep} = v/E$$

所谓淌度即溶质在给定缓冲液中单位时间间隔和单位电场强度下移动的距离。

（三）电渗

毛细管电泳中，由于石英毛细管内壁上的硅羟基团（SiOH）电离成 SiO^- 使表面带负电荷，当与溶液接触时，可在溶液中产生过剩的正电荷，与上述负电荷平衡，形成耦电层；处于扩散层中阳离子在负电荷表面形成一个圆桶形的阳离子鞘；在高电场作用下，耦电层中这个阳离子鞘相对毛细管内壁运动，引起整个流体向阴极移动，形成电渗流（electroosmosis flow，EOF）。粒子在毛细管内电解质中的迁移速度等于电泳和电渗流两种速度的矢量和，一般来讲，正离子的运动方向和 EOF 一致，故最先流出；中性粒子的泳流速度为零，所以迁移速度与 EOF 一致；负离子的运动方向和 EOF 相反，因此如果 $V_{eo} > V_{ep}$（即电渗流速度大于电泳速度，且一般情况如此），负离子将在中性离子之后流出；这样就可因各种离子迁移速度的不同而实现分离。

图 24-2 中放大了的毛细管内部显示了大小不同及所带电荷不同的分子分离的过程，图示的毛细管区带电泳中，带正电荷的离子向负极迁移，与此同时，电渗流也带着中性分子和负离子向同一方向迁移。

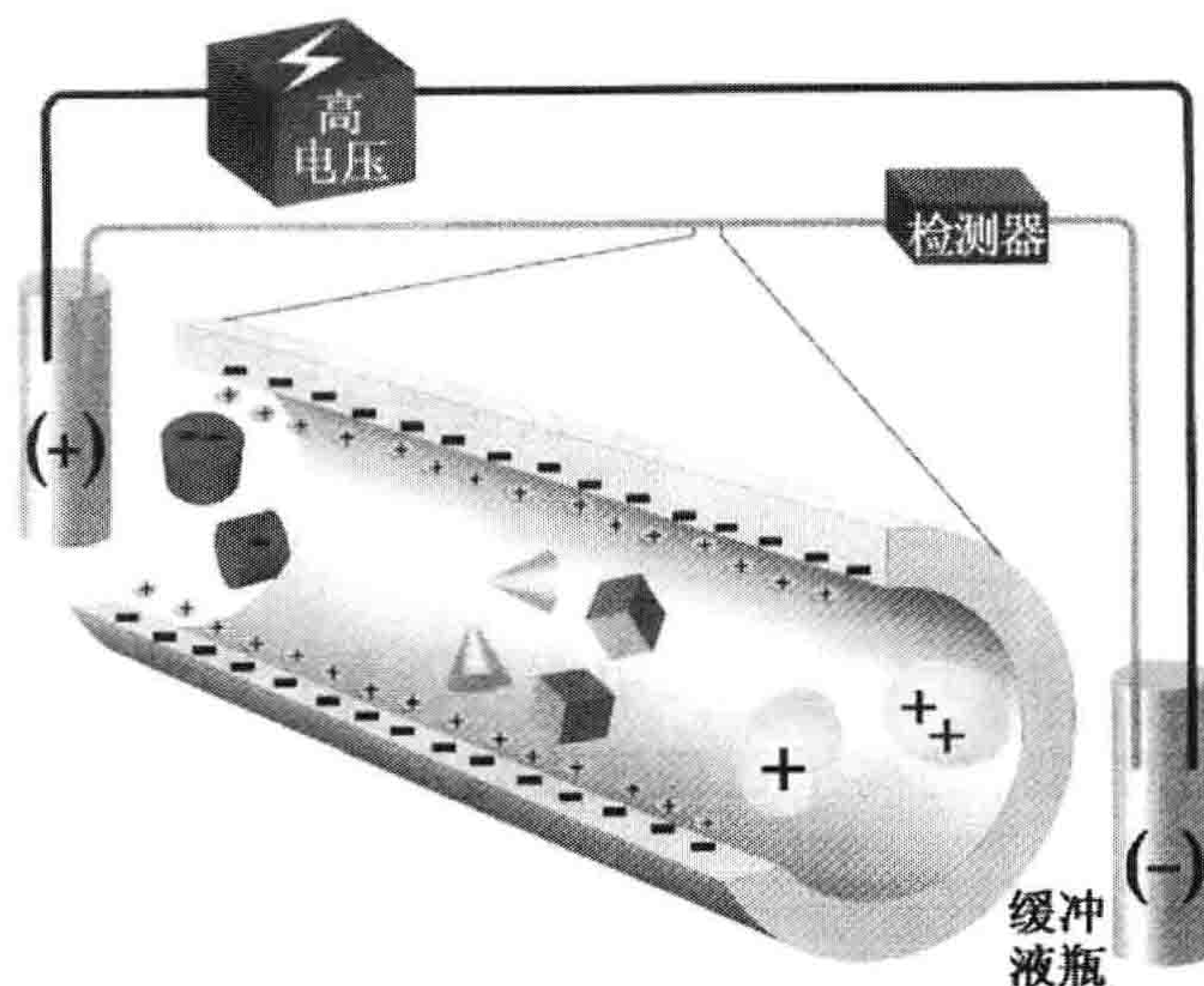


图 24-2　毛细管电泳内部分离过程示意图

通常认为这是电泳，严格讲是区带电泳分离的基础。电渗流是毛细管电泳中推动流体前进的驱动力，也是毛细管电泳中最重要和最有趣的性质之一，它使整个流体像塞子似的以均匀的速度向前推进，形成扁平的“塞式流”，这也是扩散小、柱效高的关键。

在区带电泳中，电渗流对负离子的分离可能有利，但对正离子的分离无益。在胶束电动毛细管色谱中，通常需要较大的流向阴极的电渗流作为推动力，而在凝胶电泳和等电聚焦中，则必须尽可能地消除电渗流。但无论哪种操作模式，电渗流都是极其重要的一种物理现象，对它的有效控制是研究的热点。一般电渗流随 pH 升高、电流加大或柱温升高而增大。测定电渗流可用中性物质（二甲基亚砜、β-萘酚、丙酮等）作标记物。

（四）淌度

前面已经介绍了淌度的概念，它在电泳技术中有着重要的意义。因为电泳分离的基础是建立在各分离组分有效淌度（effective mobility）的差异上。这里先详细介绍一下淌度的概念，淌度的概念可以分为绝对淌度、有效淌度和表观淌度。

绝对淌度（absolute mobility，μ_{ab}）是在无限稀释时单位电场强度下离子的平均迁移速度。它是该离子在一定溶液中的一个特征物理常数，在相关手册中可以查到有关离子绝对淌度的数据。

而实际上，我们不可能在无限稀释而又没有其他离子影响下进行工作，所以就需要引进有效淌度（μ_{ef}）的概念。有效淌度是实验测出的离子淌度，它是所有产物的离解度（α_i）和分子的第 i 离子形式的绝对淌度（μ_i）乘积之总和，即

$$\mu_{ef} = \sum_i \alpha_i \mu_i$$

μ_{ef}取决于许多因素，包括离子半径、溶剂化作用、介电常数、溶剂黏度、离子形状、电荷、pH、离解度和温度等。有些情况下，两个溶质在完全离子化状态下（$\alpha=1$）有相同的 μ_{ab}。但是它们的 pKa 值不同，与 pH 的依赖关系也不同，在相同的 pH 下，它们具有不同的淌度。因此，按照它们 μ_{ab} 值是不能达到分离目的的，而调节到一个合适的 pH 时，则可以得到分离，这即是有效淌度与绝对淌度的联系和差异。

在毛细管电泳中，由实验决定的实际的离子迁移速度，称为有效迁移速度（v_{ef}）可由下式计算：

$$v_{ef} = \frac{l}{t_m}$$

式中：t_m 为离子由进样口迁移至检测点（即等于有效长度）所需时间，称为迁移时间，或保留时间（t_r）。用有效淌度表示为：

$$\mu_{ef} = \frac{l}{t_m} \cdot \frac{L}{V}$$

实际上，电泳与电渗流并存，因此，在有 EOF 存在下，不考虑它们之间的相互作用时测得的离子迁移速度是电泳和 EOF 两个速度的矢量和，即

$$v_{ap} = v_{ef} + v_{eo} = (\mu_{ef} + \mu_{eo})/E$$

或者表示为

$$\mu_{ap} = \mu_{ef} + \mu_{eo}$$

式中：v_{ap} 为表观迁移速度；μ_{ap} 为表观淌度（apparent mobility）或净淌度（net mobility）。

（五）分离效率与分离度

CE 中的分离效率用理论塔板数（the number of theoretical plates，N）表示，其理论表达来源于色谱理论，用 Giddings 方程定义为

$$N = \frac{l^2}{\sigma^2}$$

式中：l 为迁移距离，即有效长度；σ^2 是区带中浓度分布的方差（variance）。

如果溶质纵向扩散是区带展宽的唯一因素，则区带方差 σ^2 由 Einstein 方程给出为

$$\sigma^2 = 2Dt_m$$

式中：D 为溶质的扩散系数，因为迁移时间（t_m）可表示为：$t_m = \frac{l}{\mu_{ep}E} = \frac{lL}{\mu_{ep}V}$ 则可以得到

$$N = \frac{\mu_{ep}Vl}{2DL}$$

在 EOF 存在下，用表观淌度（$\mu_{ef} + \mu_{eo}$）代替上式中的 μ_{ep}。则 N 表示为

$$N = \frac{Vl}{2DL}(\mu_{ef} + \mu_{eo})$$

从上式可以得到以下结论：使用高电场，可以得到高的分离效率；EOF 速度大，可以得到高的分离效率，因为溶质在柱中的停留时间短；扩散系数小的溶质，像蛋白质、DNA 等生物大分子，有较高的分离效率。

分离度（resolution，R），也称分辨率，是指将淌度相近的组分分开的能力。它是分离技术中的一个重要性能指标。如同淋洗色谱一样，用无量纲的数来表示两个组分（i 和 j）的分离度。按 Giddings 方程，组分 i 和 j 的分离度 R_s 写作

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4}\left(\frac{\Delta v}{\bar{v}}\right)$$

式中：$\frac{\Delta v}{\bar{v}}$ 为两相邻组分（i，j）的相对速度差，不考虑 EOF 时，它等于两相邻组分的相对淌度差。

$$\frac{\Delta v}{\bar{v}} = \frac{\Delta \mu_{ef}}{\bar{\mu}_{ef}}$$

于是，$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4}\left(\frac{\Delta \mu_{ef}}{\bar{\mu}_{ef}}\right)$，即分离度是效率项 $\frac{\sqrt{N}}{4}$ 和选择性项 $\left(\frac{\Delta \mu_{ef}}{\bar{\mu}_{ef}}\right)$ 的乘积。

实际上，当考虑 EOF 时，用 $\mu_{ef} + \mu_{eo}$ 代替 μ_{ef}，则可得到

$$R_s = \frac{1}{4\sqrt{2}}\Delta \mu_{ef}\left[\frac{Vl}{DL(\mu_{ef} + \mu_{eo})}\right]^{1/2}$$

从上式可以看出，R_s 是下列 4 个因素的函数：外加电压（V）、有效柱长与总长度之比（l/L）、电泳有效淌度差（$\Delta \mu_{ef}$）和 EOF 淌度（μ_{eo}）。如果 μ_{ef} 的数值与 μ_{eo} 接近而方向相反，则 R_s 将变得极大，迁移时间变得极长。

通常，在电泳图上读出两相邻峰的迁移时间和它们的峰宽（W），按下式计算 R_s

$$R_s = 2(t_{m2} - t_{m1})/(W_1 + W_2)$$

式中：$(W_1 + W_2)/2$ 为峰底的平均峰宽（以时间为单位）。

（六）区带宽度和区带增宽

混合组分中由于各个组分的电迁移速度不同，在 CE 分离过程中形成了各自的区带，并逐个迁移依次通过检测点（在柱检测），理想的区带由单个组分组成，反映在电泳谱图上就是以迁移时间和峰宽为特征的电泳峰。它是以检测器系统的响应作为时间函数得到的。因此，淌度大且与 EOF 同向迁移的组分，迁移速度快，先到达检测器，迁移时间短。相反，与 EOF 反向迁移的组分，淌度越大，表观迁移速度越慢，迁移时间也越长。因为记录是以时间为单位，所以，峰的宽度或由此代表的区带宽度称为时间宽度（W_t）。即使实际长度相等的区带，由于各个区带的迁移速度不同，它们通过检测器区域所需的时间也不相同，产生时间宽度不等的峰，如果不经过校正，就会给柱效计算和定量分析带来误差。可通过假设检测器的检测区域为无限窄（δ函数）来给出柱上区带的真实长度，这种经过校正后的宽度称为空间宽度（W_s），以长度为单位。这种校正对峰高无影响。

实际上，检测器区域不是无限小的，它的空间宽度（W_d）因检测器而异。对吸收检测器，W_d 在几百微米；对电导检测器，W_d 小于 50μm。因此，除了对区带迁移速度校正外，还必须对检测器窗口宽度进行校正。校正可由下式给出：

$$W_s = \frac{l}{t_m} \cdot W_t - W_d$$

CE 分离的基础是溶质电迁移速度的差异。在电迁移过程中，各种组分区带不仅由于它们的迁移速度不同而被分离，也同时由于其一系列的分散因素，如扩散等的作用而不断地被增宽。为了能对两个淌度相近的物质得到很好的分离，了解和控制可能存在的分散因素，使过程的分散作用最小是至关重要的。

实际上，除了纵向扩散外，还有许多因素也会使样品区带中的溶质分散，导致区带增宽，如由焦耳热引起的温度梯度，以及溶质和管壁的相互作用等。考虑到各种分散因素的影响，用系统总方差（σ_T^2）来描述所有分散因素对区带增宽的影响，于是

$$\sigma_T^2 = \sigma_{Dif}^2 + \sigma_{Inj}^2 + \sigma_{Temp}^2 + \sigma_{Ads}^2 + \sigma_{Ele}^2 + \sigma_{Det}^2 + \sigma_{oth}^2$$

右边各项下标分别表示扩散、进样、温度、吸附、电分散、检测和其他。

除 σ_{Inj}^2 和 σ_{Det}^2 外，其他方差与迁移时间成正比，其比例系数是各项的发散系数 D_i，于是可以得到

$$\sigma_T^2 = \sigma_{Inj}^2 + \sigma_{Det}^2 + 2t\sum_i D_i$$

在 $\sigma_T^2 = \sigma_{Dif}^2 + \sigma_{Inj}^2 + \sigma_{Temp}^2 + \sigma_{Ads}^2 + \sigma_{Ele}^2 + \sigma_{Det}^2$ 中，其右边的前 5 项是方法所固有的分散，不可能完全消除，但只要仪器设计合理和条件选择得当，可以将其控制到最小程度，从而达到最高的分离效率。

二、毛细管电泳的几种作用模式

CE 泛指以高压电场为驱动力，以毛细管为分离通道，依据样品中各组分之间淌度

和分配行为的差异而实现分离的一类液相分离技术。与 HPLC 发展中形成反相、正相、离子对等分离模式一样，为适应不同的分离要求，CE 已发展出毛细管区带电泳（capillary zone electrophoresis，CZE）、胶束电动毛细管色谱（micellar electrokinetic capillary chromatography，MECC 或 MEKC）、毛细管等电聚焦（capillary isoelectric focusing，CIF）、毛细管凝胶电泳（capillary gel electrophoresis，CGE）、毛细管等速电泳（capillary isotachophoresis，CITP）和毛细管电色谱（capillary electrochromatography，CEC）6 种不同的分离模式。这 6 种模式各有利弊，用途不一。其中，以 CZE、MECC 和 CGE 最为方便，普通实验室也较常用。下面做简单介绍。

（一）毛细管区带电泳

毛细管区带电泳（CZE）是最基本、操作最简单、应用最广泛的一种模式，通常被看作其他模式的母体。其基本原理为：在毛细管内电解缓冲液中，不同种类离子的电泳迁移率不同可导致不同的运动状态。分离机制主要基于在特定 pH 下物质具有不同的溶解度。在石英毛细管中，电渗流通常与最常用的缓冲液有很大关系，比注入样品中单个离子的电泳迁移率影响还要大。

因此阳离子和阴离子在同一方向可加以分离。阳离子被阴极吸引，且电渗流可加速其迁移率。虽然阴离子被阳极吸引，但却在电泳介质流的影响下向阴极移动。因此，带电荷最多的阳离子迁移速度最快，接着是带电荷较少的阳离子。所有中型物质紧随其后，因为其带电量为零。最后才是阴离子，带电荷量少的阴离子比电荷量多的阴离子迁移得早。在一般电泳中迁移速率最大的阴离子在 CZE 中最后才开始迁移。需要注意的是：调整缓冲液的 pH 会影响离子的离子化程度，改变其电荷/质量比，最终导致迁移率的改变。图 24-3 是毛细管电泳区带电泳示意图。

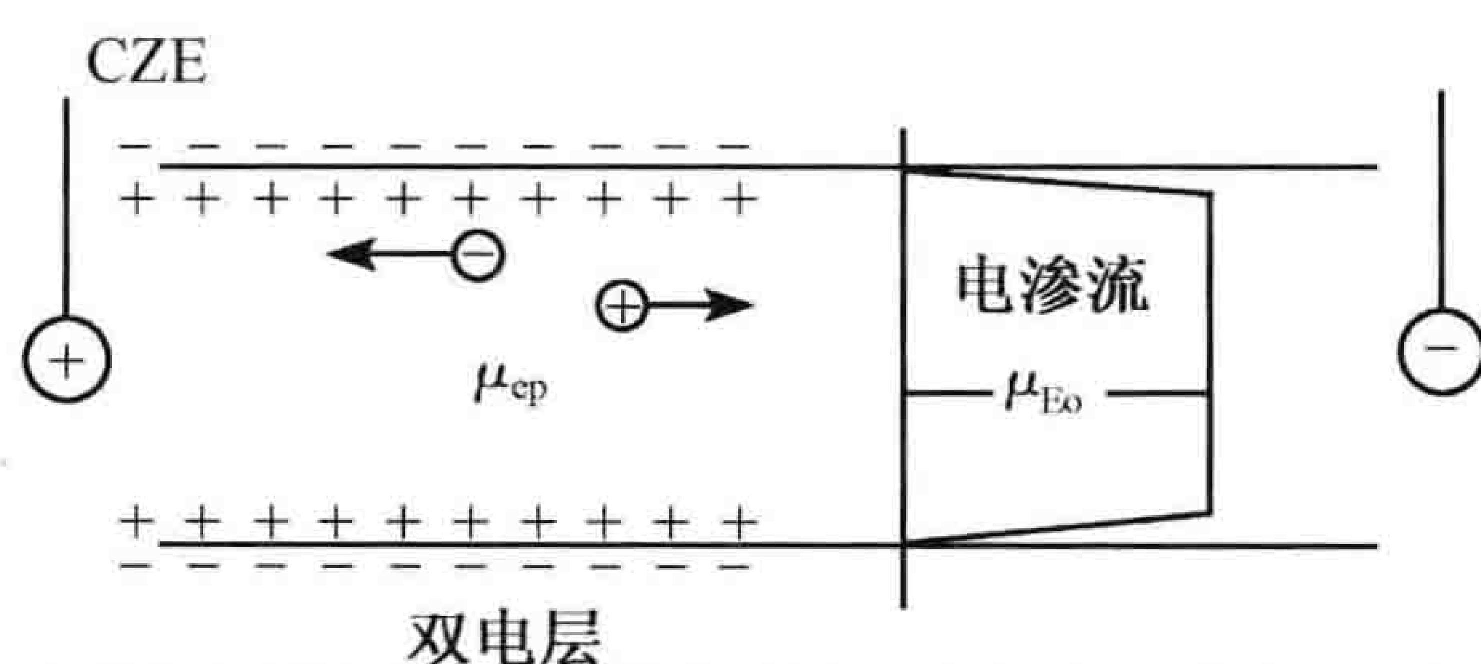


图 24-3　毛细管区带电泳示意图

（二）胶束电动毛细管色谱

胶束电动毛细管色谱（MEKC）的主要分离机制是基于物质在胶束相与溶液相中分配系数的不同。把离子表面活性剂（如阴离子表面活性剂 SDS）加到缓冲液中，当其浓度超过临界浓度（critical micelle concentration，CMC）时，便会聚集形成一具疏水内核、外壳带负电的亲水胶束。溶质分子则在极性缓冲液与胶束中心的非极性相（准固定相）之间有一定的分配。中性粒子因其本身疏水性不同，在二相中分配存在差异。在电渗流作用下，胶束携带溶质一起前行，疏水性强的粒子和胶束结合牢，流出时间慢，不同分子在两相中的分配差异是本法分离的基础。虽然这些带负电的胶束被正极吸引，但在石英毛细管中，由于电渗的影响，它们仍向阴极移动。但由于阳极的吸引，这些胶束向阴极的移动速度比液体慢一些。中性粒子在胶束内外的分配系数取决于其亲水性，因此 MEKC 中的胶束多被称为固定相。憎水性很强的中性分子

（如甲醇）不会在胶束中停留，因此会和溶液以相同的速度移动，流出较早；相反，亲水性很强的分子，如苏丹-III，会在胶束中停留很久，因此会和胶束一起，流出较晚。其他中等亲水性物质会在两者之间流出。分析物的分离是电荷/质量比、亲水性和电荷在胶束表面相互作用等因素共同作用的结果。这项技术和毛细管电泳一样，提供了一种分离带电粒子和中性粒子的方法。其示意图如图 24-4 所示。MEKC 使一般 CE 不能分离的中性物质得以分离，这是对 CE 的极大贡献。如再引入环糊精及其衍生物、胆酸盐等形成的手性胶束，则具有手性拆分的能力，这将极大方便手性药物的拆分工作。

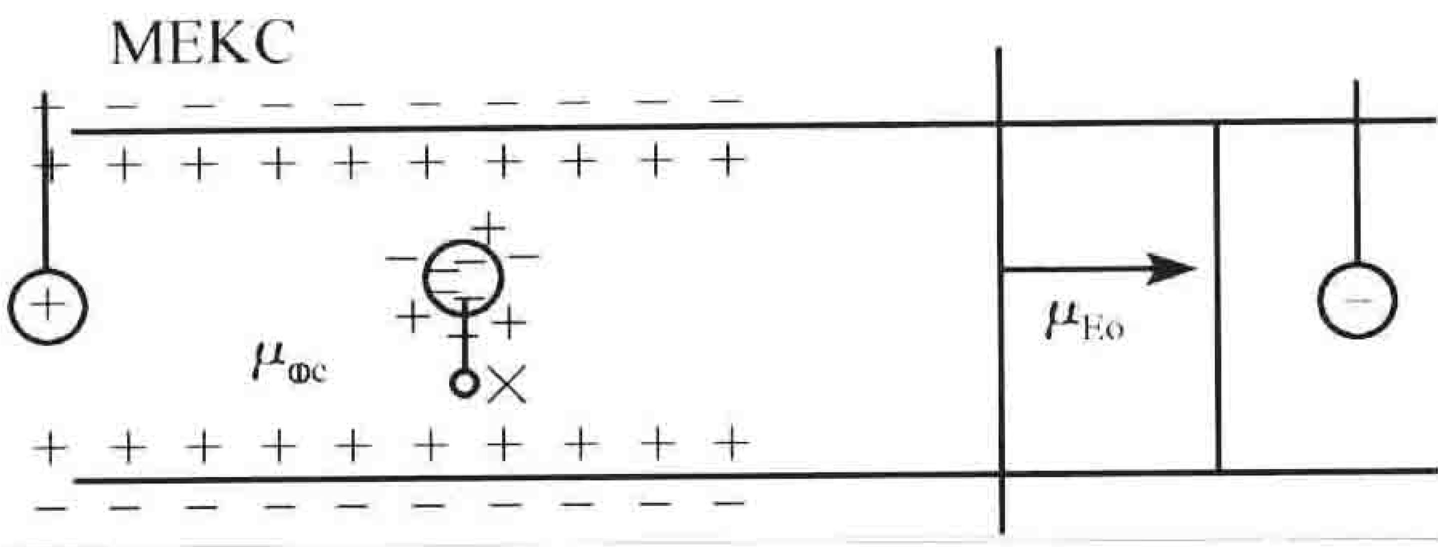


图 24-4　胶束电动毛细管色谱

（三）毛细管凝胶电泳

毛细管凝胶电泳（CGE）的主要分离机制是基于分析物通过凝胶柱孔时具有不同的分辨率。凝胶在电泳分离中应用潜力很大，主要是因为凝胶是具有分子筛效应的分离介质。作为一种抗对流介质，凝胶可使溶解扩散降至最低，这样有助于峰形尖锐，防止发生在毛细管壁上的游离吸附，消除电渗。CGE 是将板上的凝胶移到毛细管中作支持物进行的电泳（图 24-5）。但 CGE 柱制备较复杂，寿命短，重现性也不好。现已有人研究用黏度较小的线性聚合物，如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素代替普通的聚丙烯酰胺（PAGE），则可获得无凝胶，但仍有分子筛作用的“无胶筛分”（non-gel sieving），分离能力虽稍逊，但柱价低，寿命长，重现性好，方便实用。CGE 和无胶筛分广泛用于蛋白质和 DNA 片段的分离。

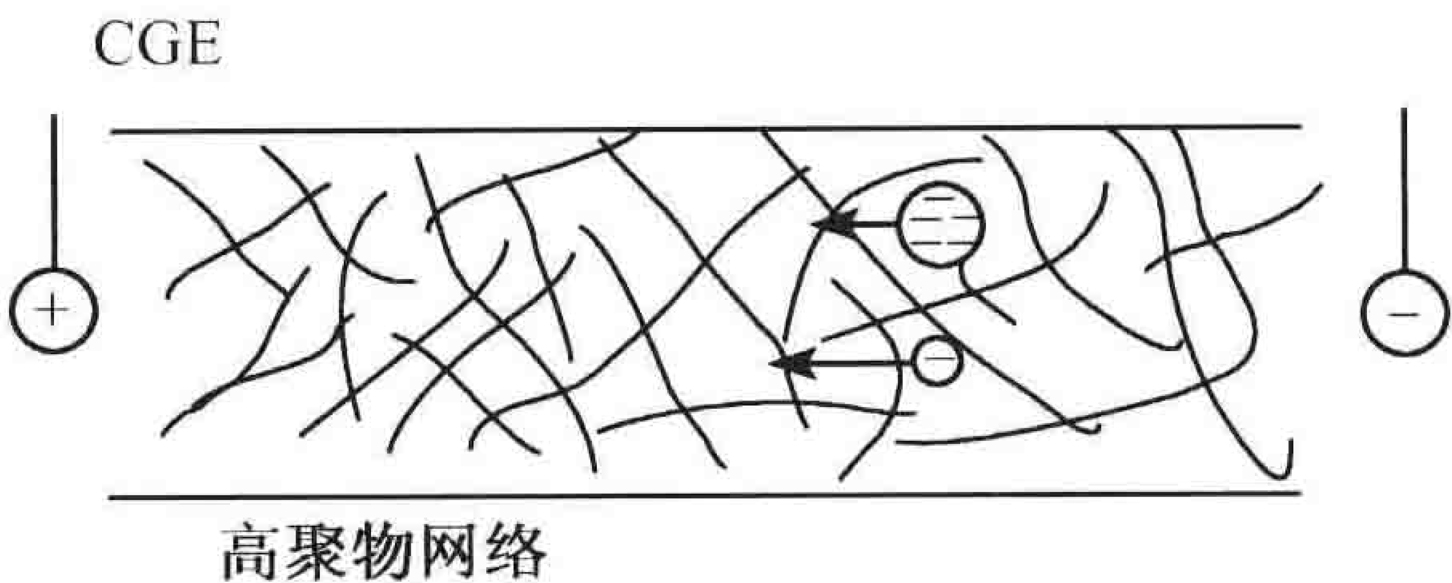


图 24-5　毛细管凝胶电泳示意图

（四）毛细管等电聚焦

在毛细管等电聚焦（CIF）中，物质是根据其等电点的不同加以分离的。毛细管等电聚焦即将普通等电聚焦电泳移到毛细管中进行。它具有较高的分辨率，通常可以分离等电点差异小于 0.01 pH 单位的相邻蛋白。通过管壁涂层可使 EOF 降至最小，从而防止蛋白质吸附于管壁及破坏稳定的聚焦区带。这一分析方法主要用于蛋白质研究中。蛋白质样品和一种溶液在毛细管中形成 pH 梯度，装置将阳极置于酸性溶液（阳极电解液）中，阴极置于碱性溶液（阴极电解液）中，加高电压（6～8kV）。几秒钟后，毛细管内部建立起 pH 梯度，使两性蛋白质顺梯度迁移至各自的等电点处，停下聚焦，产生一窄的聚焦带，到达稳态。此后，形成的区带继续移动，或者，将盐（如 NaCl）加入到阳极电解液（酸性溶液）或阴极溶液（碱性溶液）中，由于电中性原则，Na^+ 可置换 H^+，破坏 pH 梯度的平衡导致组分的迁移，使聚焦后的蛋白质依次通过检测器向阴极运动时，得以检测。合适的溶液可获得较大的吸收峰，并且当整个试管同时聚焦时，可

有较好的成峰能力。但在等电点时，蛋白质易沉淀而堵塞柱子，可通过调整聚焦时间、电压、蛋白质浓度及添加剂等加以解决。

（五）毛细管等速电泳

毛细管等速电泳（CITP）是在毛细管内进行的等速电泳。它和其他电泳技术一样，也是根据样品的电泳淌度不同进行分离，常用于分离离子性物质。然而，CITP 的操作在一个不连续的缓冲液体系中进行。为了达到等速电泳分离，必须具备两个特殊条件：一是特殊电解质系统，即要具有一定 pH 缓冲能力的前导电解质（leading electrolyte，LE）和终止电解质（terminating electrolyte，TE）。样品离子的有效淌度应比 TE 大、比 LE 小，LE 和 TE 构成不连续的电泳介质环境。二是背景电流要小到足以克服区带电泳效应。样品组分在前导组分和末端组分之间被压缩形成一个稳定的迁移区域，由一些不变的样品区带组成。因此这一操作与其他类型的毛细管电泳不同，如 CZE 是在一个一致的缓冲液体系中进行，并且样品区带不停变换形状和相对位置。在一个典型的毛细管区带电泳的分离过程中，所获得的电泳分离图谱和色谱分离法所得分离图谱有相同的吸收峰，但在 CITP 中，等速电泳分离图谱包含一系列阶梯，每一阶梯代表一个分析物的区带。其他毛细管电泳中，样品的量可以用色谱图上吸收峰以下的区域来度量，而在 CITP 中，样品的量是与区带长度成比例的。目前此种模式应用不多，但已有人成功地用该方法分析了酮替酚、胆酸盐和β-内酰胺类抗生素。

（六）毛细管电色谱

毛细管电色谱（CEC）是一种比较新的分离分析方法。它包括填充柱电色谱（packed capillary electrochromatography）、开管柱电色谱（open tubular electrochromatography）和薄层电色谱（planar electrochromatography）等多种形式。近年来 CEC 成为许多色谱工作者竞相研究的课题，在国际上引起了广泛的重视。毛细管电色谱是高效液相色谱和毛细管电泳的有机结合。采用柱塞流（电渗流）来推动流动相，不仅克服了高效液相色谱中用压力驱动流体流速不均匀引起的峰扩展，而且柱内无压降，使得峰扩展只与溶质扩散系数有关，因而使 CEC 的理论塔板数远远高于 HPLC，能达到接近于高效毛细管电泳的高理论塔板数；同时由于引入了 HPLC 的固定相，使 CEC 具备了 HPLC 固定相所具有的高选择性，使它不仅能分离带电物质，也能分离中性化合物。

近年发表了不少有关 CEC 的论文，从不同角度对 CEC 进行了综述评论。其中 Knox 的有关填充柱电色谱的经典性论述和 Smith 等对填充柱电色谱的基本问题和色谱柱制备的论述都比较突出。在惠普公司的“HP^{3D} 毛细管电泳系统——毛细管电泳的新模式”中也宣称 CEC 的柱效比 HPLC 高一个数量级。不仅如此，近年 CEC 从理论到应用的研究以及 CEC 柱制备技术的研究也如火如荼地进行，如用溶胶-凝胶技术制备的开管液相色谱和电色谱固定相，分子印迹聚合物填料制备毛细管电色谱柱分离手性苯丙氨酸等。对 CEC 的进一步研究必定是毛细管电泳未来发展的方向之一。

三、影响毛细管电泳分析精密度的因素及解决方法

虽然毛细管电泳因其分离效率高，分析速度快、样品用量少，抗污染能力强及易自动化等特点而被广泛应用于分子生物学、医学、药学、高分子等领域，特别是在生物分析及生命科学领域中，毛细管电泳已经展示了诱人的应用前景，但是，CE 也有一个很大的缺点，即分析精密度差，用于定性的迁移时间及定量的峰面积重现性通常较难达到 HPLC 分析的水平（<2%），因此，限制了它在药品质量控制中的广泛应用。影响 CE 迁移时间重复性、定量精密度及准确度的主要因素如下。

（一）积分软件的影响

CE 所用的软件可分“新软件”和“旧软件”两类。旧软件即起初为 HPLC 系统设计后来被 CE 选用的软件，所以对 CE 的一些特殊性未考虑进去；而新软件本身就是为 CE 系统设计，积分及峰的鉴别都经过特殊设计。由于 CE 光路长度短，其测定常是在检测限附近，峰高信号小，当在低浓度缓冲液中运行时，常出现前伸或拖尾很强的三角形峰，峰形明显偏离高斯曲线，因此能否正确识别基线的问题是软件设计的关键。新软件在接近检测限时，能正确识别峰的起点和终点，而旧软件在这方面存在很大问题，它测定的不是全部的实际峰面积，把基线的噪音也加了进去，这就造成信噪比（S/N）比值低时，相对标准偏差（RSD）大。为了减少积分软件引入的误差，最好选用兼容的新的软件版本，或样品高浓度进样。对于样品本身浓度低，可采用多种方法提高浓度的灵敏度：①选用灵敏度更高的检测器，如激光诱导荧光检测器系统；②改善 CE 的检测方法，如扩大毛细管检测部位的体积或延长毛细管的吸收光路可以使检测灵敏度提高 1～2 个数量级；③采用柱上样品浓缩技术，如电堆积进样，场强放大进样等，当所选条件适合时，样品可被浓缩上百倍至上万倍。

（二）冲洗程序的影响

保留时间的精密度与分析前或分析中毛细管内表面的预处理有关。石英和玻璃一样都有硅羟基，这种硅羟基是构成氢键吸附并使毛细管内电解质产生电渗流的主要原因。中间冲洗步骤的选择对迁移时间的重复性有很大影响。同时，由于供试品或缓冲液组分在毛细管内壁的吸附，可能引起记忆效应，被吸附的分子影响毛细管的表面性质，从而影响电渗流的产生及电渗流速度。对于反向电渗流分离系统，即使加入的是结构很相似的电渗流改性剂，也需要完全不同的联用冲洗步骤，才能减少迁移时间的波动。因此，冲洗操作可稳定和改善迁移时间的重复性。通过选择合适的冲洗措施，恢复毛细管内表面，消除吸附的溶质分子，可以达到提高迁移时间的重现性的目的。

（三）温度控制的影响

作用于毛细管两端的高电压会引起电解质本身自热产生焦耳热。焦耳热在通过管壁向周围环境散热的过程中在毛细管内形成径向的温度梯度，管中心温度最高，由中心向管壁温度逐渐下降。因焦耳热的产生改变缓冲液的黏度，影响电渗流的线速度，使峰展

宽，分离效果变差，迁移时间精密度下降，因此CE中常需要减小焦耳热的产生，常见减少焦耳热的措施有减少操作电压、降低缓冲液浓度或离子浓度、用低淌度的物质组成缓冲体系等。另外，为了减少温度梯度，还可以减小毛细管内径，用温度控制装置尽量除去热量等方法来达到减少焦耳热的目的，从而减少温度控制对毛细管电泳灵敏度的影响。

（四）进样的影响

CE仪器进样体积必须非常小，区带长度应小于毛细管的有效长度（由进口至检测窗口）的1%，所以主要采用电迁移进样和流体动力学进样两种进样方式。

电迁移进样，即电动进样，是通过电渗流实现，将阳极直接置样品液中，加一定电压并控制时间，使样品迁移进毛细管。当用电迁移进样时，可以通过改变进样电压和时间来控制进样量，不仅如此，进样量还与淌度有关，因此在电迁移进样中对被迁移的溶质有一种歧视效应，即淌度大的组分迁移快，进样多，淌度小的组分则迁移慢，进样少，所以在对样品组分定量时，必须使所有样品溶液的离子浓度尽可能地保持一致，减少样品里盐的浓度，将会显著地增加灵敏度。

流体动力学进样主要是压力进样，它利用毛细管两端之间的压力差完成，不同的仪器采用的方法不同，如在进口加压、在出口抽真空或者将进口端抬高等。控制压差和时间可定量进样，进样时间与峰面积（不是峰高）呈线性关系。在压力进样时，进样体积是样品缓冲液黏度、所用压力及进样时间的函数。压力进样所用压力的变化可以通过调整进样时间自动补偿，但进样时间短时，则很难控制，这是进样时间为1s时，RSD比较大的原因。而进样时间长时，毛细作用引起的自发进样的差异对进样量的影响就有所降低。但除非检测灵敏度需要，一般来讲进样时间不宜太长，因为它增加了样品塞的长度，对峰宽和分离度存在不利作用，只要检测器能够提供足够大的信号，进样区带越小越好。因此，从这个意义上讲进样时间以短为好，但同时考虑时间太短会导致进样精密度下降，特别是在柱子较短较粗、样品浓度高的时候，所以一般进样时间为5s为宜。但流体动力学进样对黏度大的样品液或凝胶等填充柱不甚适合，自动电脑控制进样明显优于手动进样，每次进样分析后，清洗毛细管柱便可取得满意效果。

除了进样方式，其他一些因素，如进样器温度控制进样之间的冲洗措施、样品浓度、缓冲液等，对进样重复性也存在影响。因此，为了增加进样的重复性，还需注意以下事项：

1）毛细管一端插入样品溶液，应立即开始进样操作，并在操作完成后迅速将其从样品槽移至运行缓冲液中，随即开始运行，否则将会产生毛细作用及虹吸现象，引起进样误差并使谱带展宽。

2）如果电极和毛细管接触，毛细作用可能使某些样品流进间隔，使定量精密度降低，区带展宽，甚至使峰裂分，另外样品储器和缓冲液储器液面的高度不平衡所产生的虹吸现象也会使精密度下降。

3）无论电迁移进样还是流体力学进样都与溶液黏度有关，而温度直接影响溶质黏度，进而影响迁移时间及进样体积的精密度，因而恒温进样是必要的。

4）样品溶液中的溶剂必须与运行缓冲液互溶，且不会引起后者沉淀，另外前者的离子强度应低于后者的离子强度。

5）样品溶液和缓冲液都有蒸发问题，特别是在大批量样品测定中，蒸发会使进样的准确度变低，因此需合适的封闭装置以防止蒸发，通常采用带塞的样品槽和缓冲液槽，并采用冷却自动进样盘装置或引入一个装满水的开口槽，使整个进样盘保持较高的恒定湿度。除蒸发外，离子的电泳也会使缓冲液从一个槽流到另一个槽而造成损失，在这个过程中，由于水不断电离，储器中缓冲液 pH 改变，可以通过采用较大体积缓冲液储器或频繁更换缓冲液来解决这一问题。

6）最好选用内标法。合适的内标降低进样体积不一致引入的误差，并大大改善定性、定量的精密度和准确度。但必须注意所加内标应与待测组分有相似的淌度，以避免运行中电渗流改变引起的效应。为了增加 S/N 值，减小积分错误，要应用高浓度内标，此外，还需注意并非内标法就一定能改善分析精密度，根据误差传递规律，不合适的内标引入的误差在某些情况下甚至使测定结果更糟。

（五）电渗的影响

电渗一直伴随着电泳过程，在不同的 CE 模式中，对电渗流的大小有不同的要求。在区带电泳中，为了使正负离子同时分离，需要较大的电渗流，但还需考虑分离度；在胶束电动色谱中，通常需要强大的流向阴极的电渗流作为组分和胶束向阴极运动的推动力；在凝胶电泳和等电聚焦电泳中，必须尽可能的消除电渗流，因此，电渗流直接影响 HPCE 的分析速度、效率和重现性。

通过对电渗流大小和方向的控制，可以优化毛细管电泳的分离。缓冲液的组成、pH、温度以及毛细管内表面的状态是影响电渗流的间接因素，可以通过改变缓冲液的特性、对柱内表面进行处理、外加径向电场等方法来控制电渗。还要考虑电渗的其他因素：简单降低电场强度可减少电渗流速，但可能引起分离效率和分离度下降，而且调节范围有限，缓冲液浓度和离子强度增加，可使电渗流呈直线下降，但易产生较大电流引起焦耳热；缓冲溶液 pH 在一定范围内对电渗影响较大，但应注意，在较高 pH 下，电渗速度太快，组分往往不能分离；pH 太低会使毛细管表面和溶质质子化。在操作过程中要根据溶质的性质选择合适的 pH 范围。采用恒定的 pH，以控制恒定的电渗速度，保证结果的重现性。加入添加剂，可影响壁上电荷的数量及其分布，甚至改变电荷的性质，其操作也很简单，但过量的添加剂则干扰分离过程，另外这种动态涂层不稳定，目前能用的添加剂还不多，因此需要开发新的添加剂并解决稳定性问题。目前看来，管壁涂渍特别是化学键合法涂层较稳定，不仅能调节电渗流，还能减少管壁对蛋白质的吸附，这种方法在蛋白质测定中应用较多，但涂层管制作麻烦，因而简化涂层制作技术，寻找更好的涂层材料，将可能使这种电渗控制方法更具有实用意义。有人提出电渗迁移与径向电场关系的理论构架，但设备较复杂，还未形成商品仪器，但这种方法具有较好的发展前景。特别是研究表明通过施加径向电场，不仅影响电渗和分离时间，还有抑制吸附的能力，可随机调控毛细管电泳分离，这在实际样品特别是生化样品分离中有着实用意义。

第二节　组成和性能

一、仪器的组成与结构

毛细管电泳的基本设备很简单，主要有高压电源、毛细管、检测器、电解质溶液池以及相应的数据记录和处理设备组成。这些基本部件与自动进样器、多孔注射器、样品/毛细管温控装置、程控电源、复合检测器、片段收集器以及计算机界面配合使用，可大大扩展其功能。因此可将毛细管电泳仪的组成分为：进样系统（样品架、缓冲液架、定位、驱动系统）、气压系统（用于供给系统气压进样、冲洗、分离所需的动力）、电压系统（用于供给系统进样、分离所需要的电压）、光路系统（用于检测器及光源系统）、电泳系统（包括毛细管、卡盘、接口模块）、冷却系统（包括样品冷却系统、毛细管冷却系统）以及工作站系统（用于控制主机运行，采集并处理数据）。其基本的仪器结构如图 24-6 所示。早期的研究工作大多是在自己组装的仪器上进行的，而目前在国际市场上有二十多家公司出售毛细管电泳仪，主要包括：贝克曼公司（Beckman）、伯乐公司（Bio-Rad）、惠普公司（HP）、TSP 公司、沃特斯公司（Waters）等，这些商品仪器都是计算机化、自动化的装置。商品毛细管电泳仪 1988 年问世，其峰面积的精度为 5%RSD，峰高差一些，但在 1993 年其峰面积的精度就达到 1%～2%RSD，和 HPLC 的精度相当，近年 CE 的精度已经可以达到 0.5%。由于毛细管电泳的高效、快速，特别是它的有效性使其在今后很可能会将 HPLC 的方法逐个取代。

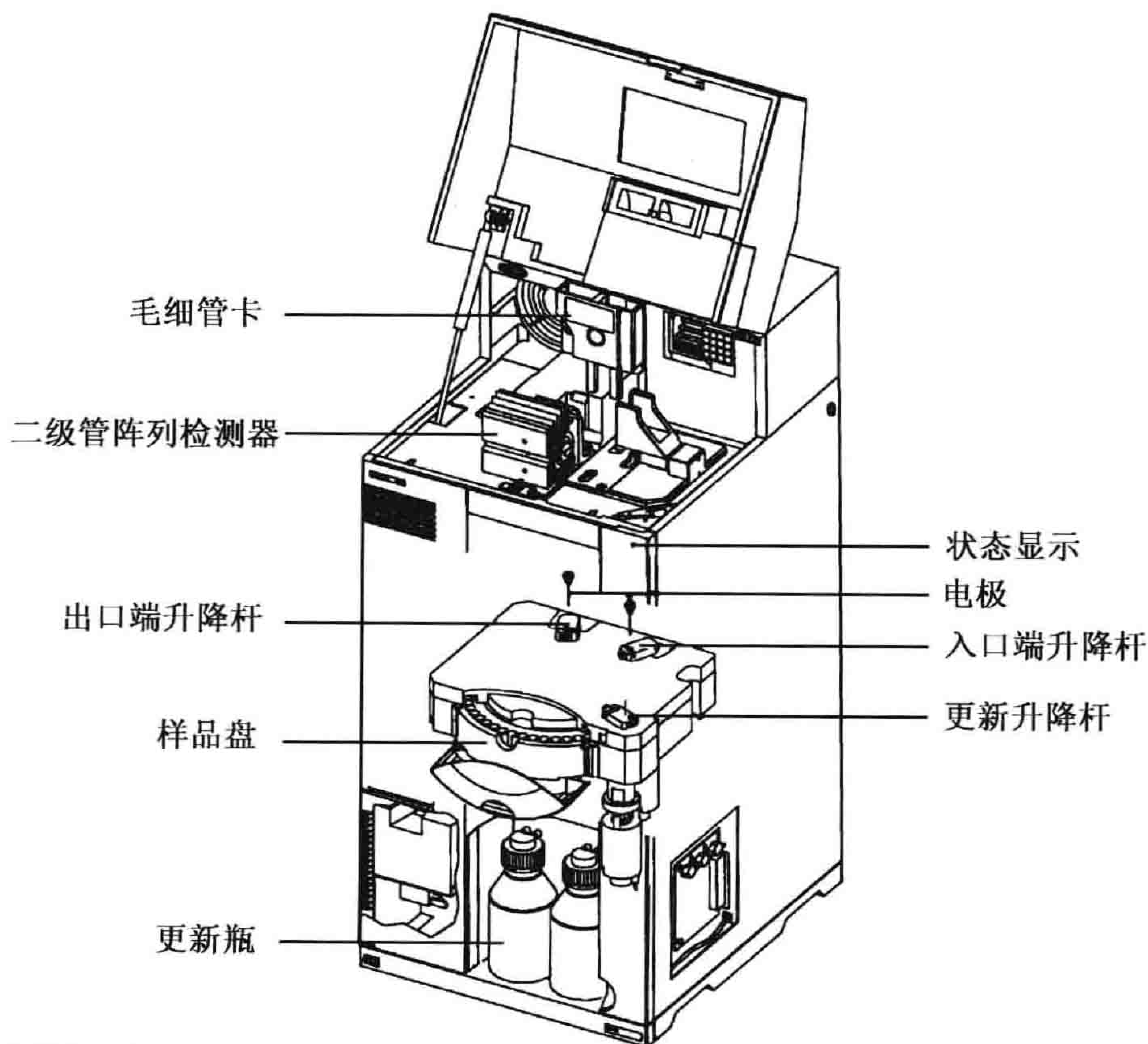


图 24-6　HP^{3D}高效毛细管电泳仪结构图

二、仪器的种类及性能特点

CE 分析仪器的完善和 CE 商品仪器推向市场，标志着毛细管电泳技术已经走向成熟和应用阶段。从 1989 年出现商品仪器以来，世界范围内已经推出多种型号的毛细管电泳仪，为进一步开展 CE 的方法研究和推广应用起到了促进作用，表 24-1 中列出了一些商品仪器的主要性能。

表 24-1 一些毛细管电泳仪器的性能指标

公司	ABI	Beckman	Bio-Rad	Colors Messtechnik	Dionex	Grom HPLC Analytic	Waters	Spectra physics
型号	270A-HT	P/ACE2100	Biofocus TM 3000	Isco 3140	CES	System 100	Quanta 4000	Spectra PHOR ESIS 1000
高压电压范围/kV	0～30	0～30	0～30	0～30	0～30	0～30	0～30	0～30
极性切换	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
恒流操作	N	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y
电压梯升	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y
电流记录	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	Y
电压记录	N	N	Y	Y	N	N	N	Y
毛细管最小长度/cm	30	20	17	38	40	20	30	37
管盒系统	N	Y	Y	N	N	N	N	Y
进样方式压力/真空	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
电动	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y
待温	N	Y	Y	Y	N	N	N	Y
温度控制恒温器	Y	Y	Y	Y	N	N	N	Y
控温范围	室温～60℃	15～50℃	15～40℃	15～40℃	—	—	—	15～60℃
控温介质	空气	液体	液体	空气	—	—	空气	空气
温度记录	N	N	Y	N	N	N	Y	Y
检测器多波长检测	N	N	Y	N	N	N	N	Y
波长范围/nm	196～360	200～360	190～800	190～360	190～800	190～800	185～540	190～800
带宽/nm	5	3	6	12	6			6
单色器	光栅	滤光片组	光栅	光栅	光栅	光栅	线性光谱滤光	光栅（LIS）
光纤	N	N	N	N	Y	N	N	Y
自动进样器样品位置数	50	22	31	40	40	—	20	80
不同缓冲液数	8	9	31	4	3	—	4	80
托盘恒温	Y	N	Y	N	N	—	N	N
防止样品蒸发	Y	Y	Y	Y	Y	—	Y	Y
样品体积/nl	5～4200	1～4500	5～500	75～500	5～500	—	25～500	10～1500
组分收集	Y	Y	Y	N	N	—	Y	N

注：Y：yes，N：no

三、有关附件的作用及其配置

毛细管电泳仪器最主要的部分就是毛细管柱和检测器。毛细管柱的性质直接影响分离的效果，也直接影响物质分离的效率；高灵敏度的检测器一直是毛细管电泳仪器研究和升级的重点，特别是近年来CE和质谱的联用，给毛细管电泳的研究注入新的活力。

（一）毛细管柱

毛细管电泳和其他色谱一样，分离的核心部件是毛细管电泳柱。虽然用未经处理的石英毛细管电泳柱可以进行多种样品的分离，但是要有效地分离生物大分子，如蛋白质，用未经处理的毛细管电泳柱就难以奏效了。解决这个问题的有效办法之一就是对毛细管电泳柱进行改性处理。

毛细管电泳柱的改性的办法多种多样，其目的都是消除石英毛细管壁的硅醇基，因为此种基团在pH大于3时电离为负电荷，对碱性蛋白质有强烈的吸附作用。解决的有效的方法是往毛细管内壁上涂渍某种高聚物掩盖管壁上的硅醇基，涂层分为离子型涂层和非离子型涂层。离子型涂层是用键合的方法把离子化合物附着在管壁上，并保持有一定的电渗流，以免溶质在管壁上吸附，阳离子涂层有利于阻止碱性蛋白质的吸附，而且适合于分离无机阳离子。在毛细管壁上涂渍的非离子型物质有聚丙烯酰胺、聚二醇类、非离子型聚乙烯醇、含氢硅油、聚甲基十八烷基硅氧烷以及各种聚合物等。其中聚丙烯酰胺树脂涂层的改性柱适合于分离高淌度、低分子质量的阴离子，而不需要缓冲溶液的改性剂。

另一方面，凝胶毛细管电泳柱和无胶筛分技术广泛地应用于蛋白质和DNA片段的分离中，凝胶毛细管电泳柱主要使用聚丙烯酰胺凝胶，制备可以使用的凝胶毛细管电泳柱十分困难，在制备过程中有难以去除的空泡生成，影响分离，近年有不少文献涉及这一课题。

无胶筛分技术是最近发展起来的分离方法，以弥补凝胶毛细管电泳柱制备困难的不足。无胶筛分技术采用不进行交联聚合的线性高聚物溶液代替交联的聚丙烯酰胺，这种线性高聚物溶液仍具有按分子大小分离各组分的作用。

（二）检测器

CE发展初期，Jorgenson曾指出CE技术的广泛应用与深入发展所面临的主要挑战是高灵敏度与多模式检测器的发展。十几年来，为了适应CE微体积在柱检测上的需要，在检测方法和检测器方面进行了大量的和卓有成效的研究，发展了许多类型的检测器，有光学、电化学及质谱学检测器等。表24-2列出了各种类型CE检测器的一般性能及简要特点。

所有商品CE仪器都配有UV-可见吸收检测器，由于其技术趋于成熟，已经成为使用最普遍的一种检测器。激光诱导荧光检测器、质谱检测器接口也在近年来推向市场。对CE检测器最基本且最重要要求就是检测限（LOD）低和对峰宽影响小。由于CE仪器的功能与应用范围在很大程度上依赖于CE检测器性能与水平的提高，因此CE检测

表 24-2　CE 检测器的检测限及其特点

检测器	检测限/(mol/L)	特点
UV-可见吸收	10^{-6}～10^{-5}	近似通用，常规应用
激光光热	10^{-8}～10^{-7}	灵敏度高，受激光器波长限制
荧光		
非相干光诱导	10^{-8}～10^{-7}	灵敏度高
激光诱导	10^{-12}～10^{-10}	高灵敏度，价格昂贵
折射指数	10^{-7}～10^{-5}	通用性强，结构简单，灵敏度较低
电化学		
电导	10^{-7}～10^{-5}	通用性
安培	10^{-9}～10^{-8}	选择性，灵敏度高，微量
质谱	10^{-9}～10^{-7}	仪器复杂，可获得结构信息，质量灵敏度高
放射	10^{-11}～10^{-9}	灵敏度高，操作放射性物质有特殊要求
间接法		通用性强，灵敏度比直接法低 1～2 个数量级
间接 UV	10^{-5}～10^{-4}	
间接 LIF	10^{-9}～10^{-8}	

方法的研究和检测器的开发一直是非常活跃的领域。本节将简要介绍几种类型的 CE 检测方法。

1. 紫外-可见吸收检测器

紫外（UV）-可见吸收检测法是 CE 分离的一种常规检测法。自 1981 年 Yang 设计出第一个在柱 UV 吸收检测器后，许多人将 HPLC 中的 UV-可见吸收检测器进行改造，并根据 CE 本身特点进行 UV 吸收检测器的设计。由于吸收检测器通用性较好，结构简单，加上商品吸收检测器已达到较高性能，因此，UV-可见吸收检测器是目前应用最广泛的一种 CE 检测器。它由光源、光路系统、信号接收和处理系统构成。

UV-可见吸收检测器采用汞灯(150～380μm)、钨灯(380～800μm) 或氘灯(190～600μm) 作为光源，用单色器或滤光片选择波长，波长准确度在 1nm 或更小。除了可以固定单波长检测外，还可以多波长检测或可编程序多波长快速扫描 (190～800μm)，进行在柱 UV-可见光谱检测。

为了不引起峰增宽，必须进行在柱检测。由于毛细管内径小、光程短，加上毛细管的圆柱面类似短焦距柱面透镜，使入射的圆形光束通过毛细管后变成椭圆光束，增加了收集难度。此外由于严重的反射和折射而损失入射功率，增加背景噪声。因此，光路系统的设计直接影响检测灵敏度和背景噪声。此外检测池性能还与毛细管内、外径尺寸、介质折射指数（RI）以及光入射狭缝和聚焦透镜至池的距离等有关。在毛细管前加球镜聚焦，灵敏度可以提高 10 倍，对峰宽影响小。所以，多数商品 UV 吸收检测器采用球镜聚焦解决上述问题。

在信号接受和处理系统方面，通常用光电倍增管（PMT）和光电二极管（PD）做单道或快扫描检测器；也可用光二极管阵列（photodiode array）检测器做多道检测。多道检测时，复合波长的光束通过毛细管后由光栅多色仪分光，在阵列检测器上成像。

用阵列检测器进行在柱实时光谱分析，可以做化合物鉴定和峰纯度的确认，在选择性和分辨率方面比一般单道检测器更好。

UV-可见吸收检测器的在柱检测，方法简单，多数有机和生物分子（特别是多肽、蛋白质等）在 210nm 左右有很强的吸收，因此，这种检测器已接近通用性检测器。但是，毛细管的短光程严重限制了它的灵敏度，使 UV-可见吸收检测器远远满足不了越来越多的对低浓度和极微量样品分析的要求。因此，为了进一步降低吸收检测限，必须在有关扩展吸收光程和提高吸收检测灵敏度的新方法和新技术上进一步进行研究。

2. 光激发荧光检测器

毛细管电泳的荧光检测，特别是激光诱导荧光（laser-induced fluorescence，LIF）。检测是所有检测方法中灵敏度最高的一种。多数情况下，LIF 的检测限为 10^{-12}～10^{-10} mol/L，比常规 UV 吸收法低 5～6 个数量级。能够进行高灵敏度检测对 CE 有着重要意义，这意味着可以使用更小孔径毛细管，外加更高电场强度，获得更高的分离效率。同时，也意味着可以处理更小量样品，使高效、快速的 CE 分离技术成为极低浓度及极微量样品（如单个细胞中 10^{-17} mol 的核苷酸）分离检测的有力工具。CE 在线荧光检测系统主要由激发光源，激发和收集光学系统，信号检测、显示或记录系统组成。高性能的荧光检测器需要对各组成部分综合考虑、认真设计，使荧光的激发和收集效率最高，背景噪声最小。大多数化合物本身不发荧光，衍生技术（荧光标记）在荧光检测中显得非常必要。恰当地选择激发波长和荧光标记试剂，对提高检测灵敏度有着重要意义。

在 LIF 中，最有趣的地方就是样品的荧光标记。虽然荧光检测有很高灵敏度，但大多数物质的荧光量子产额很低或不发荧光，特别是人们感兴趣的一些生物分子，如氨基酸、多肽和多数蛋白质等。因此，需要借助衍生（derivation）或标记（labeling）技术对不发荧光的样品进行荧光标记，利用一种或几种试剂（本身不发荧光）与待测组分作用，使待测组分转变为能发荧光的衍生物，提高检测灵敏度。按照衍生过程是在分离之前之后或在柱完成，分别把衍生化称为柱前（precolumn）、柱后（postcolumn）和在柱衍生（on-column derivation）。柱前衍生是在分离进样前将样品进行荧光标记；在柱衍生是在分离后在柱中引入衍生试剂，与分离组分反应后在柱检测；而柱后衍生必须在特殊设计的衍生反应器中完成衍生并检测。常用的一些荧光衍生试剂有荧光素异硫氰酸盐（FITC）、荧光胺、临苯二醛（OPA）等。

化合物的柱前衍生比较简单，适用于氨基酸、小肽和糖，但不适用于大的肽段和蛋白质，因为会产生多重标记，在 CE 中出现多重峰。此外，柱前衍生对低浓度或小体积样品（如细胞）的标记困难，容易混进杂质，而且要求衍生产物稳定。因此，多数情况下在分离后进行衍生。柱后衍生需要在柱后反应器中进行，一般存在 3 种柱后反应器：同轴式柱后反应器、自由溶液柱后反应器和隙结柱后反应器。

3. 电化学检测器

CE 电化学检测有 3 种基本模式：安培法、电导法和电位法。安培法测量化合物在

电极表面受到氧化或还原反应时，失去或得到电子，产生与分析物浓度成正比的电极电流。而电导法和电位法是测量两电极间由于离子化合物的迁移引起的电导率或电位变化。

用于 CZE 中的电化学方法却不像微柱 LC 中那样简单，在多数情况下，用于分离的高电场对检测产生严重的噪声干扰。分离电流比检测池中测量的电化学电流高几个数量级，它的微小波动都给电化学检测带来非常高的噪声水平。因此，如何有效地消除或减小来自分离电压的噪声是电化学检测器设计的一个重要方面。近年来，采用连接器或端柱检测隔离高电压的干扰，收到很好效果。在电极设计上也有进展，使检测范围有所扩展，LOD 达到阿摩（amol）水平。电位法灵敏度低，即使采用离子选择微电极在柱检测，LOD 也高于 10^{5} mol/L，所以相对其他两种模式，应用较少。

在 CZE 中，电化学检测法的灵敏度高，检测体积小。因此可用于窄孔径（内径<25μm）毛细管检测，为微体积环境（如单细胞）研究提供了高灵敏度方法，特别是对无机离子和有机小分子（如羧酸）的检测，因为它们的吸光系数小，UV-可见吸收检测器无能为力，而电化学方法却很有效。然而，电化学检测要求溶质具有电活性，检测范围局限在那些容易氧化或还原的溶质，因此目前正在努力寻求一些方法扩展它的应用范围。

4. 质谱接口

质谱（mass spectrometry，MS）法灵敏度高，专属性强，能提供分子结构信息，是非常理想的一种 CE 检测器。CE 的高效分离与 MS 的高鉴定能力相结合，使得能用纳升级样品进行分子结构分析和分子质量的准确测定，成为微量生物样品分离分析的强有力工具，近年来愈来愈受到人们的关注，特别是在多肽和蛋白质的分离分析中，备受青睐。

MS 用作 CE 的检测器有离线检测和在线检测两种方式。离线检测是将 CE 分离组分收集后，送到 MS 离子源进行 MS 分析。在线检测是分离毛细管直接耦合到 MS 中进行 MS 检测。CE-MS 在线结合的仪器主要包括 3 个部分，即 CE 系统、CE-MS 接口和 MS 仪器。CE 和 MS 已有成熟的商品仪器，LC-MS 接口也较成熟。但是，CE-MS 结合后功能的发挥程度如何，即不降低 CE 的分离效率，满足 MS 分析进样要求，达到 MS 仪器的质量分辨率和检测灵敏度，则完全依赖于接口性能的完善。因此，近年来 CE-MS 检测法的研究主要集中在接口的设计与性能改进方面。目前较成熟的接口有电喷射接口、连续流-快原子轰击（continuous flow-fast atom bombardment，CF-FAB）接口和离子喷射（ionspray，Is）接口。

第三节 使用方法

一、基本操作

下面以惠普公司的 HP^{3D} CE 为例，介绍毛细管电泳仪的基本使用方法。

（一）仪器的安装

一般情况下，新购置仪器的安装都由仪器公司按照用户选购的配件进行安装。对于毛细管电泳仪的安装，用户一般应注意以下几个问题：

1）要根据仪器说明书上的尺寸、重量、要求的环境温度、湿度，在实验室选择合适的位置安放仪器，还要根据总电源的电压及电压波动情况、电源频率、仪器的功率等情况选择电源。

2）需将所购仪器的配件工具包以及待用附件备放完好，并熟悉其使用方法。

3）电泳仪使用与装配时，要按照说明书确保电缆线连接正确，电源设置和保险丝工作正常，并熟悉仪器保险丝的规格。

（二）仪器使用前的准备

1. CE 仪器开机之前的准备工作

在开机之前，要根据不同型号仪器保证各种软硬件准备齐全。HP^{3D} CE 要求更新瓶已安装好且拧紧瓶盖；紫外灯经过预热；样品小瓶和缓冲液小瓶准备充足；毛细管装入毛细管卡盘中；卡盘（带有一根安装好的毛细管）被装入系统中，卡盘门和样品盘门已关闭；准备好更新系统。当完成这些工作时，就可创建或调入一个 HP^{3D} CE 测试方法。

2. 启动仪器

打开仪器电源，启动 HP^{3D} CE 仪器并启动计算机，仪器启动之后，风扇和泵开始工作。从 Windows 程序管理器中启动 HP^{3D} CE 化学工作站软件，进入 HP^{3D} CE 化学工作站组的在线仪器图标，使仪器完成初始化过程（该步骤是自动化仪器的通用步骤），初始化完成后，系统进入准备好状态。

3. HPCE 主屏幕出现

不同自动化仪器软件设计风格不同，因此主屏幕上的内容和排列方式都有所不同。HP^{3D} CE 主屏幕上有系统部件的图标，点击部件图标可以改变方法参数以及使用仪器的控制。HP^{3D} CE 系统包括：序列分析、单个小瓶分析、调用方法、保存方法、调用序列、保存序列、改变显示进样区域和示意图的格式、改变显示进样区域和两个在线信号显示的格式、显示当前笔记本、显示当前序列笔记本、当前序列显示、当前方法显示、运行时间显示、状态显示、进行序列分析时样品盘或样品小瓶的显示信息等 16 个图标。

（三）运行测试

1. 方法设置

采用毛细管电泳法进行测定时，除规定的分析模式、检测方法（如紫外或荧光检测器的波长、电化学检测器的应加电位等）应按规定的操作条件进行外，其他参数如毛细管内径、长度、缓冲液的 pH、浓度、改性剂（甲醇、乙腈等有机溶剂）、运行电压的

大小、运行时间的长短、毛细管的温度等，均可根据所用仪器的条件和预实验的结果进行必要的调整。HP^{3D} CE 图形用户界面中有 HP^{3D} CE 状态、样品盘、进样、二极管阵列检测器、时间显示、分析模式、门、在线窗口、卡盘温度、进口/出口升降装置、电压值、废液瓶、内部压力、电解质瓶、状态条、能量值、检测器波长/光谱 17 个部分，改变某一部件的值就选择相应的图标，随后会显示一个弹出菜单，该菜单包含 3 组项目：帮助菜单、方法参数和仪器控制。其中点击帮助可获得感兴趣对象的更多信息；方法参数用于改变当前方法。当执行改变了的方法时，这些变化就反应在 HP^{3D} CE 的示意图中；仪器控制用于仪器的直接控制，该操作由主机执行，且这些变化反应在 HP^{3D} CE 示意图中。

2. 运行方法

每一种方法都包括：基本参数、老化处理、进样参数、电参数、时间表和检测器参数等。其中基本参数包括：升降设置、卡盘温度、进口端小瓶、出口端小瓶。可在分析中的 5 个时刻激活基本参数，它们是调用方法后、从“运行控制”菜单中激活“运行方法”或“运行序列”时、完成进样后、在停止时间过后以及整个分析（包括分析后老化）完成后。从运行控制（Run Control）菜单中选择运行方法（Run Method）即开始进行测试。

3. 准备更新系统（可选项）

在多次分析中缓冲液的组成会发生变化。在 HP^{3D} CE 中，更换缓冲液的方法是更新。更新系统会自动抽空样品盘上的缓冲液小瓶，并把电解质瓶中的新缓冲液注入小瓶中。典型的更新是在每次分析之前或每次分析之后进行，这取决于运行缓冲液的稳定性和体积。

4. 馏分收集

在生物科学和药学领域经常需要馏分收集功能，以便通过离线分析技术。例如，MALDI/TOF-MS 或蛋白质测序来表征被分离的成分。HP^{3D} CE 的馏分收集采用来自内置二极管阵列检测器的信息来判断一个峰出现在出口端电极的准确时间。

馏分收集前首先在尖底小瓶中注入 10～15μl 适当的溶液，把尖底小瓶放入样品盘中（任意选择），在 CE 基本参数屏幕中把升降设置为 3mm，找到压力条件下的迁移时间值，在 DAD 设置中把阈值设定为一个适当的值，设置峰宽和实际峰宽相近，选择正确的收集模式和正确的馏分收集方法进行收集。

二、注 意 事 项

不论哪种型号的仪器，在实验操作过程中，都应该注意以下要点：

1）将毛细管电泳仪放置于有空调的房间，保持室温恒定。同时，操作中控制毛细管及仪器恒温。

2）缓冲液加压一段时间后，淌度和电渗流会变化，要经常更换。

3）缓冲液要用 0.45mm 微孔滤膜过滤后使用。

4）对未涂渍的毛细管柱每天使用前先用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液、水及运行缓冲液各冲洗 10min 平衡。更换缓冲液时，要用水冲洗 3min 后，再用缓冲液冲洗 10min 平衡后进样。

5）样品宜溶于稀释 5～10 倍的运行缓冲液中，以获得好的峰形。

6）为提高定量准确性，宜加入一内标。在保证峰形的前提下，样品宜用高浓度，进样时间应大于 34.45kPa·s。

7）摸索实验条件时，可先用一短柱，用磷酸盐、硼砂或 Tris 在不同的 pH 条件下试验，当选定缓冲液种类时，可先改变 pH 获得最佳分离，再改变浓度以获得较好的峰形及柱效。为使分析高效、快速，电压一般可用 18～20kV。

8）每次做完实验后，用水冲洗 5min，也可将毛细管两端置于水中保存，用氮气吹干后保存。

三、仪器的常见故障排除

毛细管电泳仪是生物化学和分子生物学实验室的常见分析检测仪器，应用广泛。在使用过程中难免会出现各种各样的问题，直接影响到仪器的保养、所测数据的准确性。操作者若能了解产生故障的原因，就可清楚地预防和排除这些故障，并使其发挥最佳效能。以美国 BECKMAN 公司生产的 P/ACEMDQ 毛细管电泳仪为例介绍该类仪器使用中需要注意的问题。

1）检查压杆及弹簧是否安装，若确定已安装好，用水或乙醇清洗较脏的瓶盖以防开机运行仪器时缓冲液瓶及样品瓶脱落，出现掉瓶。

2）经常检查 Ribbon Cable，用轻质润滑油处理 XYZ 移动滑杆表面，同时定期在滑杆上涂润滑油，以保证 XYZ 移动滑杆能够正常工作。

3）样品瓶帽老化或电极安装不正确，使电极升降时样品瓶压弯电极，因此要及时更换样品瓶帽，校准并重装电极。

4）检查缓冲液瓶及样品瓶，确保在气压冲洗、进样、分离检测样品时气压指示正确。

5）由于气压变化引起流速变化，导致缓冲液瓶及样品瓶液面太低，电极及毛细管接触液面较少或悬空，不能实现回路，产生电压、电流错误。此外，缓冲液离子强度过高、毛细管中有断处（特别在窗口）也是产生电压错误、电流错误的主要原因，因此要检查缓冲液瓶及样品瓶的液体量是否达到了要求、缓冲液的离子强度是否太高以及毛细管中是否有断处，尤其是窗口处是否有损坏，确保电压、电流正确。

6）检测过程中有时会遇到不出峰的现象。其原因可能是电压极性相反或毛细管柱断裂造成的，可考虑将电极极性进行调换或重新换用柱子排除故障。

7）P/ACEMDQ 毛细管电泳仪主机电源打开后，机器自行自检，5min 后自检结束。然而在更换检测器时新安装的光源与主机接触不良等因素会导致仪器自检不能通过。可通过关机后，将检测器重新安装，确保接触到位，以完成自检。

8）处理好毛细管，对毛细管进行清洗，使用平衡好的毛细管，以保证自由溶液 CE 分离具有高效性和较高的重现性。

9）缓冲液在样品检测过程中起着非常重要的作用。毛细管电泳中常用的检测器是紫外检测器，因此，从降低基线噪声和提高灵敏度方面考虑，应该使用紫外吸收小且杂质含量少的色谱纯试剂。必要时应对缓冲液进行过滤及脱气处理。同时要注意使用新配制的缓冲液，进样时出口放半瓶缓冲液以降低两端的压力差，改善进样精度，确保良好的重现性。

10）将卡盘的密封圈拧紧，定期充填冷却液，以防冷却液泄漏。

11）工作站是整个仪器控制的中枢，其中软件的管理非常重要，软件不能工作，整个仪器就不能运行。因此，要禁止对仪器的设置随意进行改动。对于硬件，要保证PCICPIB板接触良好。

四、仪器的维护保养

以 HP^{3D} CE 为例阐述毛细管电泳仪维护中应该注意的事项：

1）HP^{3D} CE 仪器使用一段时间后，在电极和预穿孔器上或在绝缘板下面会形成缓冲液沉淀物、灰尘以及其他固体物质，这样会导致电弧或漏电、污染缓冲液或产生记忆效应，因此需要对上述部件进行定期清洗，大约一周一次。如果峰显示出不正常的拖尾或肩峰，观察到电弧或漏电现象，或使用了尿素缓冲液，都必须进行清洗。

2）仪器使用一段时间后，定位装置的狭缝常会被毛细管断裂、聚酰亚胺碎片或灰尘污染，这样会导致噪声增大、信噪比不在技术指标范围内或使仪器错误，因此需要对毛细管的检测窗口和定位装置的狭缝进行必要的清洗。

3）更新系统用于自动排空小瓶并重新注入缓冲液，用于防止在多次分析中缓冲液组分的变化。为保持该系统正常工作，在首次使用、更换缓冲液、更新系统闲置一段时间这 3 种情况下，需要清洗更新系统（瓶子和管子），进行保护性的维护。

4）仪器中安装的空气泵使用来自环境（通过该过滤器）的空气，从而在电解质瓶内部形成压力，冲洗毛细管和进样都需要这种压缩空气。如果环境中有很多灰尘或系统不能产生足够的压力，就应该考虑替换空气过滤器，建议每 3 个月更换 1 次空气过滤器。

5）长时间光强度的损耗会增加基线噪声，因此需要对灯进行更换。如果不是其他原因（如被污染的狭缝、毛细管内部一些吸附物等）导致噪声水平的极度增加，或灯无法点亮，就应该考虑更换灯。工作大约 1000h 后光强度一般降低 50%（在 230nm 测量）。建议在更换灯之前检查灯的光强度，以确定噪声增加不是由于其他原因（毛细管内部的气泡、被污染的定位装置或检测器窗口）引起的。有可能未冷却的热灯常在第一次难以点亮，应等到灯冷却后再打开。

不同型号的仪器应按照说明书和相应的专业书籍进行仪器的使用、维护和保养，不同型号的仪器都具有各自设计上的个性，因此很难将仪器的所有保养事项一语道尽，但是不论哪种型号的仪器其使用和保养的思想却是统一的。那就是仪器的使用要在安装后，预检好，测试工作准备好的前提下进行；使用前对说明书要认真阅读详细了解注意事项和故障排除办法；使用过程中要严格按照说明书进行；使用后要注意清洗和维护好仪器；长时间放置仪器，要定期检修和维护，让仪器试运行，以保证仪器经常处于正常

状态，同时还要注意节约仪器的使用寿命。

第四节　在分子生物学领域中的应用

一、氨基酸和肽的分析

毛细管电泳，特别是毛细管区带电泳，在肽分析中的应用，已从小的合成肽和普通的低分子蛋白酶消化产物的分离分析发展到大的重组肽和实际样品的酶消化复杂产物的分离分析。毛细管区带电泳已广泛应用于由DNA重组技术得到的激素肽和治疗肽的表征分析，其中涉及降解、脱酰胺化（deamidation）、蛋氨酸氧化以及由于糖的微小不均一性所造成的肽的唾液酸异构化等。

除上述一般的分析和表征外，毛细管电泳的另一个重要的用途是做肽图（peptide mapping）。生物和药物科学的发展对肽和蛋白质的结构分析提出了十分迫切的要求，而肽图作为任何一种蛋白质测序工作的第一步，是目前对蛋白质进行鉴定和表征的最重要、最有效的手段之一。毛细管电泳能得到用于进一步测序的肽片段，也能通过比较分析得到蛋白质变种和改性的信息。不仅如此，通过在毛细管中加入一个微反应器的办法，能将少量蛋白质分解成肽片段，甚至可以在紫外检测的毛细管电泳仪上完成10^{-9}g级的样品的检测，因此毛细管电泳已可用来制作微蛋白质的肽图。

蛋白质测序的第二步是测定蛋白质中氨基酸的组成及其实际顺序，这些操作中需要非常纯的单一肽馏分，因此毛细管电泳被用来作为微制备的工具，收集微量的单一肽馏分，现已证明毛细管区带电泳具有收集足以用于蛋白质测序的肽的能力。

二、蛋白质分析

在蛋白质分析中有3个问题比较明显，一是蛋白质-蛋白质相互作用，二是吸附，三是稳定性。在任何有关蛋白质的运输过程中都要考虑蛋白质之间的相互作用，毛细管电泳也不例外。这种相互作用包括结合和解离，同一蛋白质的集聚，不同蛋白质或蛋白质与其他大分子（如肽、寡核苷酸等）之间的结合或集聚，底物与辅因子键合，以及与相邻组分不同的专一或非专一的键合。无论是对毛细管电泳的实验设计或是对分析结果的解释，都必须考虑蛋白质的这些相互作用。因此，通常宜尽量使蛋白质处于随机结构的正常状态，毛细管电泳常用的方法是加入高浓度的选择性变性剂，如尿素（6～8mol/L），但pH和温度改性则不宜采用。

三、核酸分析

DNA是由戊糖、磷酸和碱基组成的一类线形大分子，分子质量大小不同的DNA片段有恒定的电荷/质量比，因此使用毛细管自由溶液区带电泳这种依荷质比不同而分离的电泳方式不能进行DNA的分离。鉴于此，必须在电泳中引入筛分机制，在毛细管内填充筛分剂后，溶质在毛细管内不仅受到电场力的作用，而且还受到筛分剂的体积排阻作用，因此具有相同荷质比但是分子大小不同的物质也可以得到分离。依据筛分介质

的状态不同，毛细管筛分电泳有凝胶电泳和无胶筛分电泳之分，这两种分离方式都可以用于基因的分离分析。

不仅如此，毛细管电泳也广泛应用于基因突变研究、基因突变引起的遗传疾病、肿瘤以及病毒感染疾病等的临床诊断研究以及法医检验等研究的分离分析中，并将在今后的发展中不断显示出其潜力。

四、糖　分　析

糖一直是分析化学界公认的难以分离的一类物质，其原因有：一是它的熄灭系数（extinction）很低，很难直接通过吸收或荧光检测；二是它的极性极强，亲水，因此很难用传统的反相 HPLC 或 SFC（超临界流体色谱）直接分析，必须借助于衍生；三是它不易挥发，也不能用气相色谱（GC）直接分析，虽然单糖可以在衍生后用 GC 分析，但对于大的寡糖仍有困难；四是它们的化学结构非常相似，异构体很多，分离困难。

常用于糖类分析的技术有薄层色谱（TLC）、气相色谱（GC）、高效液相色谱（HPLC）及超临界流体色谱（SFC）等。另外，采用脉冲安培检测（PAD）的高效阴离子交换色谱（HPAEC）与快速原子轰击质谱（FAB-MS）和核磁共振质谱（NMR-MS）联用，外糖苷酶降解与凝胶渗透色谱（GPC）联用等，也可以用来测定糖的结构。

糖类的毛细管电泳分析存在两个问题：一是多数糖类解离程度十分微弱，且具有较强的亲水性，致使利用样品淌度差异的毛细管区带电泳（CZE）和利用样品疏水性差异的毛细管胶束电动色谱（MECC）都难以直接解决糖的分离问题。二是多数糖类不具备很强的紫外和荧光生色基团，使分离以后的检测有一定困难。

五、手性分子的分析

毛细管电泳的手性分离是近年来颇受重视和欢迎的方法。因为在生物的手性环境中，生命物质的分子、药物分子、农药分子的手性不同会表现出截然不同的生理、药理、毒性作用。因此人们不得不对具有光学活性的手性药物给以特别的重视，而随着生命科学，特别是生物化学和药物化学的发展，对光学活性的手性药物的需要越来越大，手性对映体的分离和光学纯度的确定已普遍引起人们的重视，欧、美以及日本等发达国家的一些厂家都在相互竞争生产高效的光学纯药物制品。

而要获得高光学纯度的手性化合物的方法很多，但主要是通过不对称合成的方法和对映体分离的方法获得。在分离和检验光学对映体纯度的方法中，色谱法已成为一种重要的手段。特别是毛细管电泳是分离手性化合物最为有效和最简便经济的方法。

分离手性异构体主要有两种方法，间接法与直接法。间接法的要点是：手性异构体分子通过共价键和一反应试剂作用，形成一对非手性异构体，这一方法既不导致外消旋，也不会出现动力学上的歧视，而形成的两个非手性异构体具有不同的物理和化学性质，从而可以使用一般的非手性分离技术把它们分离开。这一方法是否成功决定于找到一个好的衍生化试剂，且手性分子上要有可以反应的官能团。直接法的要点是：利用手性选择剂或手性固定相和手性异构体分子作用，形成暂时的过渡性非手性异构体分子的络合物，它们在固定相上的分配系数不同或与手性选择剂的结合常数不同而得到分离。

在 CE 中手性选择剂大多是以添加剂形式加入到背景电解质中，但也可以掺杂在凝胶基体中或用键合到毛细管壁上的手性固定相进行分离。手性选择剂不必要光学纯，这是一个很大的优点。到目前为止，绝大多数关于毛细管电泳手性拆分的报道都是将手性选择剂溶解在缓冲液中作为手性添加剂来完成的。

在 CE 中使用了大量的手性选择剂，其中的一些在实际分析中得到了广泛的应用，由于分离机制的不同可以把手性选择剂分为以下 5 类：①用形成主-客体包含化合物分离手性化合物，这一类中主要是环糊精及其衍生物和冠醚；②用手性胶束的 MEKC 分离手性化合物，这一类中或是用手性表面活化剂的 MEKC，或是在非手性表面活化剂中加入手性选择添加剂；③用形成金属配合物的手性选择剂分离手性化合物；④用手性聚合物作手性选择剂分离手性化合物；⑤用大抗菌素作手性选择剂分离手性化合物。

近 10 年来，毛细管电泳技术的迅速发展，为手性分离，特别是分析提供了新的途径，成为一个极其活跃的领域。与其他方法相比，毛细管电泳分离效能更高，仪器装置相对简单，又可进行选择性操作，特别是所需缓冲液的量及进样量极小，柱子成本很低，因此操作费用大大降低。

毛细管电泳分离手性化合物的操作模式一般有毛细管区带电泳（CZE）、毛细管胶束电动力学色谱（MECC）、毛细管凝胶电泳（CGE）和等速电泳（ITP）等。α、β、γ-环糊精（CD）及其衍生物、冠醚、胆汁盐、手性混合胶束、手性选择性金属络合物、蛋白质、糖及表面活性剂是目前毛细管电泳中用得较多的手性选择剂，其中尤以环糊精最为常用，一般占手性选择剂的 50%。

六、毛细管电泳在药物及临床分析中的应用

毛细管电泳用于药物成分分析，具有快速、准确，试样处理简单，试剂用量少等优点，已经广泛应用于药物质量分析。

毛细管电泳用于药物原料的痕量分析，具有多组分、低含量和同时分离分析能力。不仅如此，由于药物配方十分复杂，各种成药制剂中常常含有蛋白质、肽和其他化学组分；作为药剂有效成分的稳定剂或保护剂，且微克级的活性成分常需要毫克级的稳定剂保护，因此，成药质量分析方法必须具有排除高含量复杂基体干扰，进行检测痕量的能力。毛细管电泳在这方面具有突出的优势。

在临床诊断方面，一些由于体内代谢紊乱引起的疾病，在体液或细胞中常常出现某种代谢产物分布异常，积累增多或者严重不足的情况。这类疾病就可以通过临床化验做出诊断。但是，必须要求化验方法具有多组分同时检测的能力。作为临床诊断的手段，毛细管电泳不仅具有快速、同时多组分测量的能力，还具有自动化、用量少及试样处理简单的特点。已经应用于氨基酸失调、核酸失调等内分泌失调疾病以及其他疾病的诊断。

第五节　毛细管电泳仪的进展和发展趋势

毛细管电泳是近十几年来高速发展的一种分离分析技术，是电色谱的一个重要的分

支。毛细管电泳柱效高、分析速度快、应用范围广、操作简便易行的优点，特别是可用于生物大分子的分离，引起了众多科学家的极大兴趣，所以近几年来有关毛细管电泳的文献激增，商品毛细管电泳仪器也大量涌入市场。

由于毛细管电泳在生命科学领域中的应用潜力，使人们对这种技术本身的研究有进一步扩大和深化的势头，其中特别是毛细管电泳-质谱联用（CE-MS）和柱技术。

CE-MS的研究从本质上来说是属于检测器的范畴，即把质谱看成是毛细管电泳的一种检测工具。毛细管电泳检测器的研究主要集中在两个方面，一是激光诱导荧光，二是质谱。前者在DNA的分离测序中显得特别突出，在国外的实验室已用得比较普遍。CE-MS联用则是当前极受重视的一个方面，从历史上看，毛细管气相色谱-质谱（GC-MS）联用的成功对色谱在石油化工等领域的迅速推广起到了根本的促进作用，可以想像，有着如此强大分离能力的毛细管电泳和质谱的联用将会对生命科学的发展带来巨大的影响。电喷射离子质谱（ESI）可以确定100 000Da的分子，对蛋白质鉴别特别有用，因此被视为与毛细管电泳联用的首选仪器。目前由于存在和CE-MS界面，以及离子从液相到气相再通过质谱仪有关输运过程的一些技术局限性，其灵敏度还不是很好，但如果能使该过程允许离子高效地传到气相，然后进入质谱仪，同时又能使质谱仪有效地利用离子，那么就有可能大幅度提高灵敏度，并进而做单细胞层次蛋白质的分析。

就目前商用毛细管电泳仪中最常用的紫外检测器而言，核心的问题是如何进一步提高灵敏度。和HPLC相比，它有两个问题，一是池体积小，二是光路短。毛细管电泳中紫外的池体积通常比HPLC的小3个数量级，而光路则短2个数量级。因此，需要从两方面加以改进：一是从化学上着手，包括采用低吸收的缓冲液和浓缩样品，使用强场强放大进样等；二是从仪器上着手，包括增大光池，采用低选择性波长（190～200nm）等。新一代的仪器中有些加了快速扫描（如Bio-Focus3000、Bio-Rad），可同时对多个波长做快速扫描，画出相应的三维吸收光谱图；有些装有二极管阵列（如Hp 3D，Hewlett Packard）检测器。除此之外，研究得比较多的是激光诱导荧光检测器，这种检测器和毛细管凝胶电泳相配是进行核酸序列测定的重要工具，激光聚焦性能好，可聚焦到一个非常小的对象上，最适合于用作毛细管电泳中荧光检测的光源，此外还有电化学检测器等。

作为毛细管电泳分离的核心部件，柱系统的研制始终是很多人关注的重点，具体工作大体分为3类：一是柱壁涂渍或改性；二是缓冲液和添加剂的选择；三是筛分，包括交联的凝胶筛分和采用线性聚合物而不交联的无胶筛分。在柱系统中一个引人注目的问题是筛分分离，这种分离从平板凝胶电泳衍生而来，但是在50μm左右内径的管子里，情况比较复杂。问题的焦点在于系统中的聚合物是经过交联的凝胶，还是曲线性聚合物分子绕在一起作为溶质形成的溶液。前面已提及毛细管凝胶电泳和无胶筛分电泳，前者有极高的分辨率，但是柱制备困难，特别是在运行过程中还会有空泡，使电流急剧减小，柱寿命降低，因此，作为常规分析的手段仍有一定困难。后者没有前者那么高的分辨率，但是制柱方便，除了分离核酸外，还可作蛋白质的筛分手段。目前的工作在于使其达到和凝胶电泳接近的柱效和更高的重复性，这是当今柱技术研

究中的一个热点。

不仅如此，把流动注射和毛细管电泳结合在一起也是一个新的思路。流动注射作为一种极好的样品富集、浓缩、预处理技术，把它和毛细管电泳结合起来，也必定会成为分离和分析技术研究的另一热点。

主要参考文献

高贵，韩四平，王智等. 2002. P/ACE MDQ毛细管电泳仪的正确使用与维护. 现代科学仪器，(6)：62～64

周先碗，胡晓倩. 2003. 生物化学仪器分析与实验技术. 北京：化学工业出版社. 222～234

第二十五章 DNA 测序仪

DNA 序列测定作为分子生物学领域中最重要的技术之一，是了解基因结构和功能的基础。在分子生物学实验室，DNA 测序主要用于鉴定新的 cDNA 克隆、确证克隆与突变，检查新产生的突变、连接和 PCR 反应产物的准确性。在某些情况下，也可用于鉴别多态性和感兴趣基因突变的筛选工具。DNA 测序技术的不断完善和仪器自动化程度的不断提高，使大型的基因组的测序成为可能。现在大多数实验室配备有测序用的寡核苷酸合成仪和自动测序仪，测序反应产物的读取不再是放射自显影，而是应用荧光检测系统，序列数据可以自动采集并传输到计算机中。使用 DNA 测序仪进行序列测定，具有快速、准确等优点，因而得到了广泛的应用。DNA 测序仪的外形图如图 25-1。

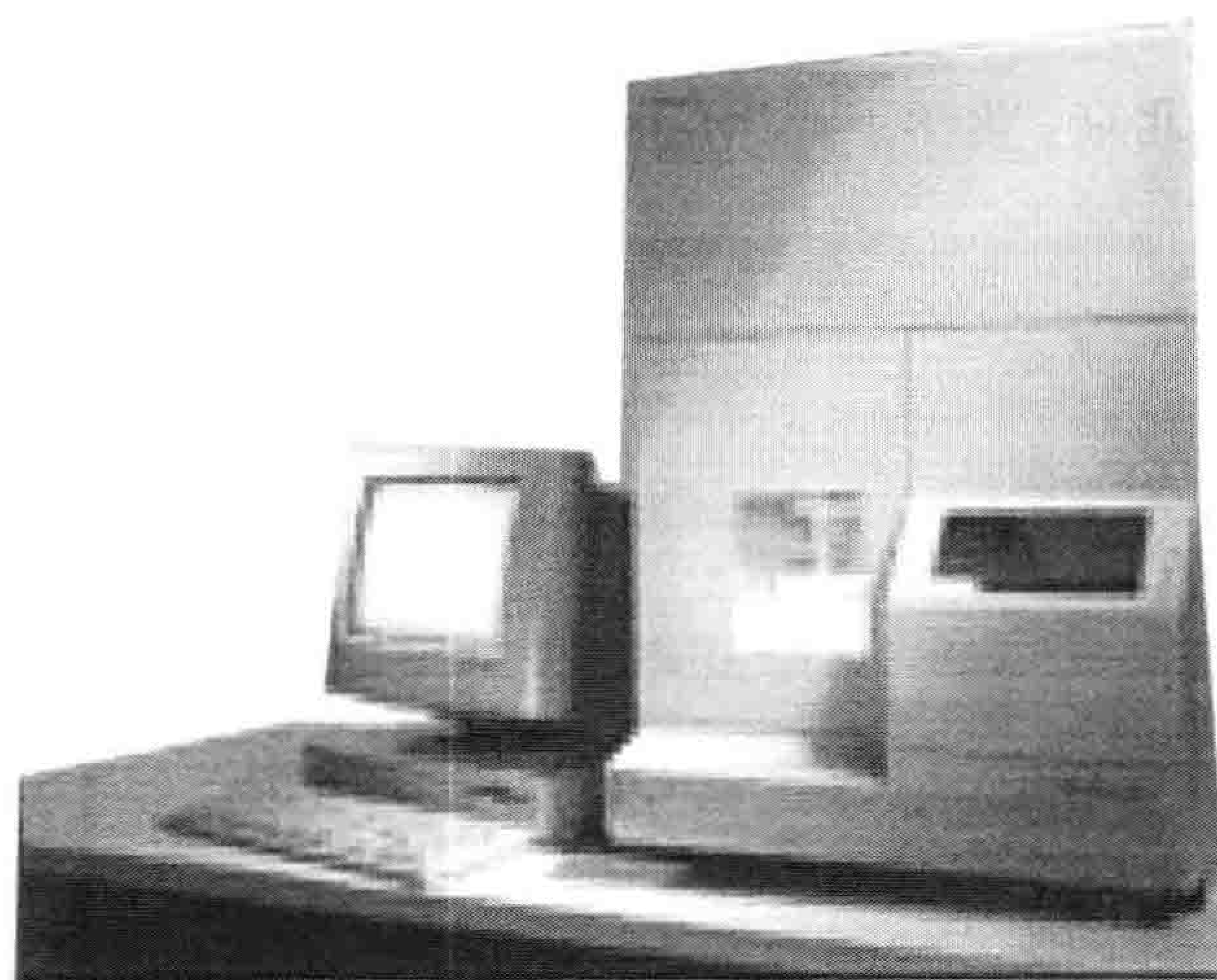


图 25-1 美国应用生物系统公司（ABI）DNA 测序仪 310

第一节 DNA 测序的基本原理

一、测序原理

DNA 测序方法主要有双脱氧链终止法（Sanger 法）和化学修饰法（Maxam-Gilbert 法）两种。目前，传统的手工测序法和仪器自动测序法均使用双脱氧链终止法。该法利用 DNA 聚合酶具有的两种酶催化反应的特性，即能够利用单链 DNA 做模板，准确合成出 DNA 互补链，并能利用 2′，3′-双脱氧核苷三磷酸作底物，将其掺入到寡核苷酸链的 3′端，终止 DNA 链的生长。在 DNA 测序反应中，加入模板 DNA，特异性引物，DNA 聚合酶，带放射性标记的 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 和 ddNTP（双脱氧核苷三磷酸），经适当温育后，产生不同长度的 DNA 片段混合物，加到变性凝胶上进行电泳分离，即可获得一系列全部以 3′端 ddNTP 为终止残基的 DNA 片段的电泳谱带模式，通过放射自显影的方法检测单链 DNA 片段的放射性带，就可直接读出 DNA 的核苷酸顺序。

化学修饰法的基本原理是用化学试剂处理末端带有放射性标记的 DNA 片段，造成碱基的特异性切割，由此产生的一组具有各种不同长度的 DNA 片段的反应混合物，经凝胶电泳分离和放射自显影之后，便可根据 X 射线胶片上所显现的相应谱带，直接读出待测 DNA 片段的核苷酸顺序。

双脱氧链终止法和化学修饰法均需使用放射性同位素作标记物，对操作人员有辐射危害，且放射性材料在保藏、处理和运输方面也相当麻烦。因此，采用 DNA 分析自动化技术的 DNA 测序仪逐渐得到了广泛应用。现在大多采用四甲基若丹明作为荧光剂，预先标记引物 DNA。带有这种引物的 DNA 片段能在激光诱导下发出荧光，从而取代同位素标记。按照标准的双脱氧链终止法进行 DNA 测序反应，聚丙烯酰胺凝胶电泳分离识别。在电泳的侧面，固定上一个激光通道小孔，在凝胶板的上面装上一套荧光信号接收器。电泳过程中，当 DNA 条带在电场的作用下，经过激光通道小孔时，带有荧光标记的 DNA 在激光的激发下便产生了荧光。荧光感受器感受到这种荧光信号后，通过信号转换器转换为电信号，再输入到数据处理系统，最后把所测得的序列直接打印出来。整个过程，仪器实行自动实时检测并自动判读，达到 DNA 测序目的。

二、影响实验结果的因素

测序结果的正确与否并不取决于测序仪的检测或其凝胶分离系统（即测序仪本身），而是由测序前所做的测序反应是否成功决定的。影响测序反应的 3 个主要因素是 DNA 模板的质量、循环测序反应的条件和变性凝胶电泳的条件。

（一）模板的影响

1. 模板 DNA 不纯

模板不纯会引起非特异性测序反应或使反应无法进行，在测序仪上得到的是杂乱的碱基序列或者根本没有任何序列出现。

来源于质粒、噬菌体等的模板 DNA 不纯，一方面是由于挑选的非单一克隆，造成重组子和非重组子混杂；另一方面是 DNA 抽提操作不严格，含过多的蛋白质和 RNA 造成的。用 PCR 产物作测序模板时，由于其反应产物中留有过剩的引物、4 种单脱氧核糖核酸（dNTP）、酶和盐等成分，会对测序反应产生干扰，因此必须先将产物切胶或过柱进行纯化。

模板 DNA 纯化后应尽快测序，否则放置过久或反复冻融会使其降解，或造成污染，这也是影响模板 DNA 质量问题的原因之一。

2. 定量不准

较简便、准确的模板 DNA 定量方法就是在 260nm 处读取其光吸收值（A_{260}），但这种定量方法的线性范围仅为 2.5～50.0μg/ml。由于模板纯化后的量极少，即便使用微量比色皿仍需经较高比例的稀释才能测定，因此当 A_{260} 换算为浓度时，往往得到过高的模板 DNA 浓度。另外模板中混有 RNA，也会使模板 DNA 浓度偏高，而测序反应的正常进行不仅要有一定量的起始模板浓度，而且不同的模板 DNA 其起始浓度是不同的。过低的模板浓度会导致反应无法进行，过高则会使测序反应停滞。

3. 难测模板

有些在 PCR 反应中能扩增的模板在测序反应中则无法进行，如模板 DNA 序列中含重复序列（小卫星）、鸟嘌呤胞嘧啶（GC）含量大于 50%以及回文序列等都属于难测模板。

（二）循环测序反应条件

1. 引物的影响

引物的正确设计是循环测序反应成功与否的关键条件之一。引物的长度应当至少达到 18～20bp，且必须避免单个碱基的长片段重复。测序用的引物需经 PAGE 或 HPLC 纯化达到测序级别后才能用于测序。引物中若混有相差一个碱基的引物时会造成序列的移位或在同一位置上同时出现不同的几个碱基，从而使测序失败。引物合成错误或保存不善、反复冻融等都会造成测序反应无法进行或产生非特异性的测序反应。测序反应中，引物与模板 DNA 的退火温度固定于 50～55℃，引物碱基数过多会影响测序反应的正常进行。

2. 富含 GC 的模板

GC 含量偏高易产生发夹结构，无法完成循环测序反应。可在反应体系中加入 5%～10%的 DMSO（二甲基亚砜），改变循环条件。在循环之前先将 DNA 于 96℃预变性，将循环的变性温度提高至 98℃。

（三）电泳的影响

电泳条件至关重要，其成败主要取决于凝胶的配制。一是电泳试剂的纯度。由于测序仪是检测荧光信号，故要求试剂不含杂质。二是配制过程。要求准确称量各种试剂；除凝胶浓度准确外，TBE 缓冲液的配制尤为重要，否则会影响电泳结果，造成测序失败，这是由于 TBE 的离子浓度高低可直接引起电泳时电压的升高或降低。三是灌胶过程要防止产生气泡、波浪纹等而影响电泳分离。

总之，在使用全自动 DNA 测序仪时，模板的纯度和浓度、测序反应、电泳分离等环节都会影响测序的结果，任何一个环节出现问题，都会导致测序失败。在保证测序试剂质量、仪器工作正常、实验人员精心操作的前提下，测序模板的纯度和浓度是测序成功的关键。

第二节　结构和性能

一、仪器的组成与结构

在众多的 DNA 测序装置中，主要采用扫描探测和固定探测两种探测系统。扫描探测法是用激光器和探测器在凝胶层上进行扫描，激发染料并收集数据。典型的凝胶扫描

系统是用一个高数值孔径的显微物镜收集发射光子。物镜在凝胶层上前后移动收集数据，并且根据物镜的位置来决定空间信息。如美国 ABI 生产的最新测序仪是用一个扫描显微物镜与一个衍射光栅结合在一起，使激发光谱发散于 CCD 探头上。显微物镜和 CCD 探头在凝胶上进行扫描，即可获得凝胶电泳图。固定探测法是将激光器与探测器固定，这样仪器的可移动部件减少，从而降低仪器生产中的失误，使仪器坚固耐用。但是不用扫描探头，凝胶层上染料的激发就出现了问题。现有一种激光侧向激发凝胶电泳荧光染料的装置（图 25-2），这一装置中激光束从凝胶层侧面照射，同时激发所有的电泳通道，从而解决了固定探测系统的荧光激发问题。另一种更优越的固定探测法是将一系列光电二极管安装在玻璃电泳圆盘的阵列上，用激光束照射凝胶层的侧面，同时激发所有的电泳通道，用光电二极管探测染料的发射。采用这种方法制成的 DNA 测序仪器没有活动部件，所以非常结实耐用。

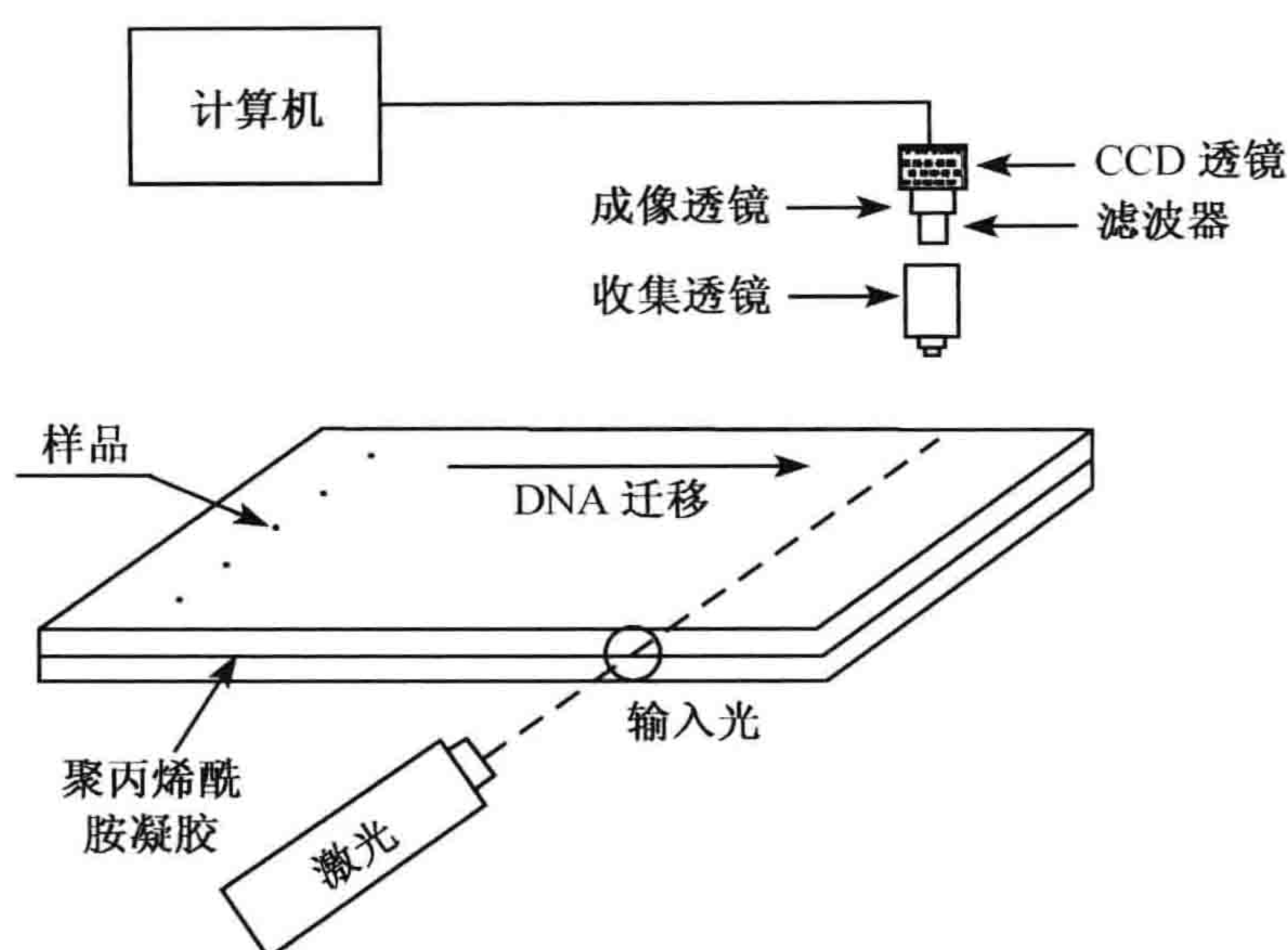


图 25-2 固定探测法装置示意图

早期的 DNA 测序仪所用的激光光源多为氩离子激光器，而氩离子激光器不但价格昂贵，而且体积较大。在蓝、绿光照射下，凝胶层、玻璃等的荧光背景较强，这既不利于仪器的小型化，又影响仪器的灵敏度。为了便于仪器的小型化和固定化，发展了应用近红外染料进行标记的 DNA 测序系统。这些红外染料的激发波长分别为 785nm 和 635nm，在这种波长的光的照射下，玻璃、聚丙烯酰胺凝胶基质和生物化学杂质的荧光背景都很弱，信噪比高。在红外区工作的另一优点是可以使用价格低廉、体积较小的固体激光器，探测器可采用光电二极管阵列。这样既有利于仪器的小型化，又可降低仪器的制作成本。

由于电泳是 DNA 测序过程中必不可少的环节，所以提高电泳速度在 DNA 测序仪的改进中就显得很重要。超薄片层凝胶电泳和毛细管凝胶电泳对于提高电泳的速度很有效。毛细管凝胶电泳可提高电泳速度，缩短电泳时间，且样品用量很少。把共焦显微镜与光电管结合研究毛细管阵列，这样可以大大提高 DNA 测序容量，但这只是处于实验阶段，还没有真正转化为商品。采用毛细管电泳技术进行 DNA 测序分析的测序仪其结

构如图 25-3 所示。

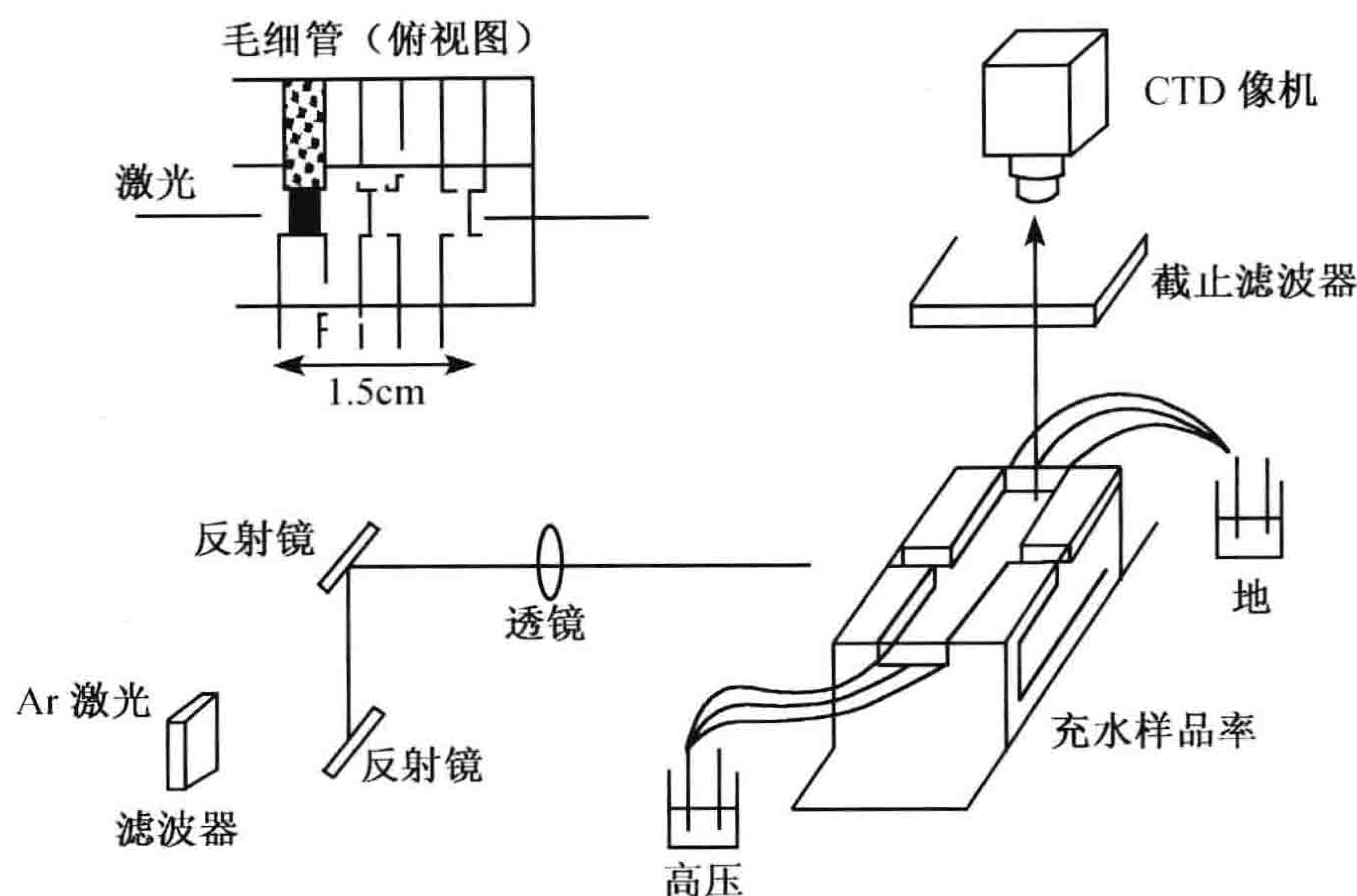


图 25-3　应用毛细管阵列进行电泳的 DNA 测序仪的结构

二、不同型号种类仪器的性能特点

常见的 DNA 测序系统有：DSQ-600L/S 全自动 DNA 测序系统、DSQ-2000L/2000S 型 DNA 序列仪、美国应用生物系统公司 377 型 DNA 测序仪、310 型 DNA 测序仪和 RISA-384 型多通道毛细管 DNA 测序系统。

DSQ-600L/S 全自动 DNA 测序系统是专为基因诊断等需要设计的，具有以下特点：测序速率较高，3h 内可高速测译 350 以上的碱基序列；除快速测序外，它还可广泛用于 PCR-SSCP 分析、小卫星片段分析、凝胶位移分析、位点置换、突变分析等基础研究。DSQ-2000L/2000S 型 DNA 序列仪的序列反应、光学系统、凝胶电泳和数据传送过程的性能比较优越，一次可进行 1200bp 以上的解析。

美国应用生物系统公司 377 型 DNA 测序仪其显著特点是采用了公司专利的四色荧光标记引物（Dye-Primer 法）或 4 种 ddNTP（Dye-Terminators 法），在 4 个反应管分别进行或在同一反应管中完成循环测序反应，然后将其产物合并或直接在同一电泳道中分离检测。该公司 310 型 DNA 测序仪采用毛细管电泳技术取代了传统的聚丙烯酰胺凝胶平板电泳进行 DNA 测序分析，繁琐的灌胶和上样过程全部由泵和自动进样器完成。每次测序之前，只需把样品放到自动进样品的样品盘中，设置电泳参数、数据收集和分析参数即可。310 型全自动 DNA 测序仪具有以下特点：应用广泛，测序及片段分析的应用包括位置序列测定、已知序列的比较测定、杂合子分析、SSCP 分析、微卫星序列分析、长片段 PCR 等；自动化程度高，自动灌胶，自动取样；多色荧光毛细管测序技术使 4 个测序反应产物可以在一根毛细管内电泳，因而测序精度较高，降低了同位素测序因泳道间迁移率差异对精度的影响；测序仪实现了全自动电脑控制，并可配带丰富的软件。由日本物理化学研究院基因组科学综合研究中心研制的 RISA-384 型多通道毛细管 DNA 测序系统是目前性能较高的毛细管电泳 DNA 测序仪，此测序仪可同时分析

384 个样品，一道可进行 600 个碱基的分析，一次运行可分析 23 万个碱基，因此有较高的测试效率。

第三节　使用方法

一、操作步骤

以第一台商品化 DNA 测序仪——美国应用生物系统公司 373A 型自动测序仪为例，介绍采用 DNA 聚合酶和荧光染料引物对 DNA 进行测序的方法。

（一）DNA 测序反应

使用 DNA 聚合酶进行测序，用 96 孔 U 型底的微量反应板进行操作。首先加入反应物进行复性反应，接着是延伸和终止反应。反应结束后，在室温中离心收集 DNA，用乙醇洗涤 1 次，真空中干燥。干燥的样品可在－20℃放置几天。

（二）DNA 测序胶的配置

1）仔细清洗玻璃板是荧光测序法的关键所在，因为尘埃和磨损可导致光的散射。玻璃板应用稀释的 Alconox 专用清洗液以软纸擦洗，温水淋洗后再用蒸馏水彻底淋洗，然后用无水乙醇淋洗，并在内表面以异丙醇擦洗，空气中干燥。隔条及梳子也应做彻底清洗和干燥。

2）将没有凹槽的玻璃板外表面朝下放在稳定的平台上，沿玻璃板两长边放置胶隔条，将带凹槽的玻璃板轻轻放在无凹槽的玻璃板及隔条上，确保两块玻璃板边沿全部对齐，且隔条准确地安放在两块玻璃板间，在每一长边用两个大夹子将玻璃板及隔条固定在一起。

3）在烧杯中加入试剂制备凝胶。

4）把适量过硫酸铵和 TEMED 加入凝胶溶液中，旋转烧杯以混匀液体并装满 60ml 注射针筒。将凝胶板装置平放在平台上，于两块玻璃板间将凝胶沿带凹槽玻璃板顶部的边缘注入，从凝胶板装置的一侧开始缓慢的向另一侧移动注射器，靠毛细管作用将胶吸入。当胶溶液的最前沿已到达胶的开口处时，停止注液，在胶的顶部凹槽中插入直缘铸模梳子。沿凹槽玻璃板顶部用三个固定夹夹牢，凝胶至少应聚合 2h。

5）取出夹子和梳子。用水淋洗玻璃板外表面以除去任何遗留的胶物质，再用乙醇淋洗，空气中干燥。用玻璃清洁剂或异丙醇清洗玻璃板的外表面，将凝胶装置放进 DNA 测序仪的电泳槽中。

6）重新启动计算机，确保 ABI 数据收集软件和数据分析软件已预置在“自动运行”中。在测序仪上启动玻璃板检查功能以确保玻璃板清洁干净，并且无污渍和凝胶物质。应用数据收集程序的“扫描”窗口扫描查看玻璃板，应看到代表 4 种荧光颜色的四条平坦的线。若看到蓝峰，意味着玻璃板上有尘埃或污点，应再进行清洗。若观察到 4 个峰，表示是胶本身污染而造成的光散射，在此情况下如果对胶做预电泳则峰可能会消

失。如果清洗玻璃板和预电泳后污染峰仍持续存在，则建议重新制胶或不在发生问题的区域孔中加样品。假如样品孔空置，则电泳完成后要检查样品轨道，确保污染峰不被记录和分析。

7）将上边的缓冲液槽和塑料标尺放置就位。用 TBE 缓冲液装满上下两个缓冲液槽，用滴管冲掉样品孔中的尿素，将测序仪和缓冲液槽的电极连接起来，关闭电泳槽的门。以 30W 恒定功率在 40℃中预电泳 30min，在预电泳过程中应当打开一个新的样品表（在“文件”菜单中），并输入适当的数据。

（三）电泳数据的收集

1）用 5μl 上样液中溶解干燥的测序反应物，98℃加热 3～5min。

2）用滴管冲洗、去除全部样品孔中的尿素，将标奇数的样品加进奇数孔中。关闭电泳室门，以 30W 恒功率在 40℃电泳 2～5min 使样品进入凝胶中去。打开电泳室门，将偶数样品加入偶数孔中，关闭电泳室门，稳定于 30W 在 40℃中电泳 10～14h。由于样品进入胶时发生盐效应，按奇数和偶数次序上样将使泳道间留下小的空隙，有利于分析软件准确地跟踪泳道。

3）用鼠标按下“收集”按钮开始数据收集。计算机收集 10～14h 的数据，在这期间建议主机不作其他用途。

4）电泳完毕后打开电泳室门，虹吸取出上边的缓冲液槽中的一部分缓冲液，拔掉电极线，切断激光电源，从仪器中小心取出上边的缓冲液槽和凝胶装置。

（四）数据分析和评估

收集数据结束后，计算机将自动启动数据分析程序。此时会建立一份凝胶文件和包含每一样品结果的测序文件。从“窗口”菜单中选择“已分析数据”，可通过放大器打开任意样品文件查看其内容，这一工具位于可移动的分析控制板上。如果主机连接有彩色打印机或绘图器，分析过的数据就可打印出来。此外，通过与其他计算机的网络连接，或利用如 NCSA Telnet 等信息交流程序可将数据在其他计算机上储存起来。

通常未掺入的标记引物会产生 4 种色块，在色块出现之后会立即开始数据分析。然而由于外源荧光信号被监测，数据分析的起始时间有时会提前。这些样品可用手工操作进行分析；可通过查看该样品的原始数据以决定样品分析的新的起始点，从“分析”菜单中选择“碱基判读”，将新的起始点输入到适当的位置。可以打开位于“窗口”菜单下面的“分析列表”以监测分析过程。

可从以下几方面发现数据质量的线索：最为明显的表现是数据的外观和范围。数据应当有相当一致的信号强度，在整个读序范围中只应有轻度的下降。有关数据质量的其他信息可从“文件信息”窗口获得。凝胶文件，包括全过程中计算机描绘的彩色“自显影图谱”也是评估数据质量的有用资料。在观察凝胶文件中的数据时，通过观察是否所有样品为白色的“跟踪线”所分开，就可知“跟踪线”的好坏。如果“跟踪线”没有很好地跟踪样品条带，该样品必须进行手动跟踪。重新跟踪结束后样品即可进行自动分析。

二、仪器的维护

DNA 测序仪的日常保养应该注意以下几点。

1）新玻璃板的处理。由于新玻璃板带有很多油渍，普通清洁剂较难清洗，故用乙醇氢氧化钾溶液或浓度为 3mol/L 的 HCl 溶液洗涤。

a. 乙醇氢氧化钾溶液的配制：将 15g KOH 加入 100ml 无水乙醇中充分溶解，该溶液最好在配制后 1 年内使用。

b. 放平玻璃板，将内面向上，铺上无颜色、吸湿性好的毛巾在玻璃板内面。

c. 把大约 15ml 乙醇氢氧化钾溶液或浓度为 3mol/L 的 HCl 溶液浸在毛巾上，让溶液停留 5min。注意勿使溶液在玻璃板上停留过长时间，以免损伤玻璃。

d. 取下毛巾，用蒸馏水或去离子水彻底冲洗玻璃板，置于超净工作台晾干。

2）玻璃板的常规洗涤。电泳结束后，报纸印去聚丙烯酰胺凝胶。美国 ABI 公司提供的仪器专用清洗液 Alconox（1%）擦洗，热水彻底冲洗，再用去离子水冲洗，置于超净工作台晾干。

3）实验结束后，尽快取下前散热板、玻璃板，关掉电源。

4）冷却溶液瓶的冷却溶液（5%抗冻剂）需每月更换，以确保电泳时聚丙烯酰胺凝胶的温度保持在 51℃。

5）不要用笔标记上下电泳缓冲液槽、电泳梳子及玻璃板，以免电泳时传送到电脑的图像出现非特异的迁移荧光性物质。

第四节　在分子生物学领域中的应用

DNA 序列测定是分子生物学领域中重要的技术之一，是了解基因结构和功能的基础。因而，DNA 测序仪便成了进行研究不可或缺的有利工具，得到了广泛的应用。随着基因诊断进入实用阶段，加速了从 DNA 水平阐述致病机制和功能的进程，DNA 测序仪广泛应用于分子生物学、基础医学、临床医学、动物学、药物学、遗传学、农业学、环境科学、法医物证学等多种领域。

一、测定人胰岛素互补 DNA 碱基序列

糖尿病病因复杂，其诊疗是一大难题。近年来，应用分子生物学技术，解决了很多疾病的诊治难题。因此彻底解决糖尿病诊治问题，应用分子生物学技术或许是一条捷径。利用 DNA 测序仪对人胰岛素互补 DNA 进行测序。将所测得的碱基序列与文献报道的人胰岛素序列相比较，从而进行分析。

二、对染色体片段进行基因型检测

迄今为止，异基因造血干细胞移植已成为治疗各种恶性血液病、遗传性疾病及骨髓衰竭症等最为有效的方法。因此，判断异基因造血干细胞移植是否成功的指标十分重要。利用 DNA 测序仪对来自不同染色体上的微卫星位点及性别位点进行基因型检测，

比较供者和受者移植前后的基因型，来探讨其在异基因造血干细胞移植中作为供者造血干细胞植活证据的可行性。通过测定结果的比较，来确定这些位点是否可以用作异基因造血干细胞的移植。

此外，DNA 测序仪还可以用于 21-羟化酶缺失病的检测、蕈状支原体种系分析、视网膜神经胶质瘤的检测和检测艾滋病病毒基因组是否突变以及亲子鉴定等方面。

第五节 DNA 测序仪的发展趋势

20 世纪 80 年代早期自动化测序的发展很快，人们不再用传统的同位素而是用荧光染料标记 DNA 分子。80 年代中期，自动化荧光测序已经可以用凝胶电泳分离双脱氧测序反应的产物，用激光激活染料分子，且荧光信号被放大，被光电倍增管捕获。但在 1990 年之前自动化测序的有效能力很低，数据复杂且缺乏质量。然而当 PCR 被利用到双脱氧法中，循环测序向前跳跃了一大步，这个方法提高了检测信号，增强了测序的敏感性。另外，90 年代中在染料化学和 DNA 聚合酶修饰技术上的提高已经成为它巨大进步的源泉。因此，1998 年时测序速率增加了约 30 倍。到 2000 年，以毛细管为基础的测序仪和机器人等高技术仪器设备的应用使效率再次极大地提高。

目前，大多数的 DNA 测序仪采用荧光光谱法鉴别荧光染料标记的 DNA 片段，只需要有一套完整的荧光激发和光谱鉴别系统即可确定 DNA 的核苷酸序列。为了使 DNA 测序仪更加简化，人们寄希望于找到一种比荧光光谱更易于探测的特性，通过对这一特性的测量很容易区分不同的荧光染料。现在研究较多的是荧光寿命法。用一些荧光寿命不同的染料来标记降解后的四种不同性质的 DNA 片段，电泳后就可以通过荧光寿命的不同来读出原核苷酸的序列了。应用荧光寿命鉴别，可以省去荧光激发系统和光谱鉴别系统，使仪器更加简化。

完整的人类基因组包括 3 亿个基本的核苷酸对，是一个相当大的数目，要想测定人类基因组顺序，就要求发展速度更快、测序容量更大、劳动强度更小的 DNA 测序仪器。由于电泳是 DNA 测序过程中必不可少的环节，所以提高电泳速度在 DNA 测序仪的改进方面就显得很重要。超薄片层凝胶电泳和毛细管凝胶电泳对于提高电泳的速度很有效。

如今，利用毛细管电泳进行测序的 DNA 测序仪应用越来越广泛。毛细管凝胶电泳是在直径为 50～100μm 的毛细管中填充聚丙烯酰胺或其他基质，在高电场下进行电泳。加大电泳电压，可提高电泳速度，缩短电泳时间。另外，毛细管电泳样品用量很少。把共焦显微镜与光电管结合研究毛细管阵列，这样可以大大提高 DNA 测序容量。

此外，还出现了超薄片层凝胶电泳，也可以提高电泳速度，因为它能在高电场下进行电泳，并且还可以在单一凝胶片层上放置多道平行样品。用激光器从侧面照射凝胶层，同时激发所有的电泳通道。CCD 照相机连续监测凝胶层上的荧光发射，用一系列四棱镜和滤波器将发射光沿 CCD 探头的方向散射开来，即可获得光谱信息。空间信息是在垂直于 CCD 的方向上获得的。这种系统的四色探测器兼具毛细管电泳的速度和平行片层电泳的测序容量。这种系统的最高速度是每小时测 18 个样品，每个样品包含

400 个基本核苷酸，也就是说每小时测 7200 个核苷酸。然而，这种系统也仅仅是在实验室中使用，还没有真正坚固耐用的产品出现。不过，随着技术的不断发展，相信不久便会有成品出现。

在过去的 15 年里，测序的仪器操作和测序化学达到了一个真正接近完全自动测序的水平。碱基识别软件、序列装配软件和模板制备技术等的进一步发展和完善显著地简化了测序操作和随后的编辑过程。结果，大规模测序计划的限制因素是仪器的购买与维修以及试剂的费用而不是大量高技术人员的参与。因此研究人员应该去完成自动测序仪所要实现的首要目的就是鉴定基因、把它们定位到实际物理图谱上，研究它们发展的根源和把它们的结构、表达模式和生物功能制成图表。DNA 测序仪的发展，为深入了解遗传物质提供了条件，它的发展必将推动生命科学的进步，这也说明物理学技术与生物学研究的结合具有相当广阔的发展前景。

主要参考文献

冯明亮，季芸，陆琼等．2002．微卫星位点检测在异基因干细胞移植中的应用研究．诊断学理论与实践，(1)：31～32

哈伍德 A J．2002．DNA 及 RNA 基本实验技术．北京：科学出版社．284～287

黄丽惜．2001．377A 型 DNA 测序仪的保养及常见故障的排除．现代医学仪器与应用，(3)：34～35

黄庆，张雪，府伟灵．2003．377 型 DNA 测序仪常见问题解析．医学信息，(7)：342～345

李玉栋，孙骞，张春平等．1999．DNA 自动测序技术进展．生物工程进展，5

刘丰，李春林，苏川．2002．ABI377 全自动 DNA 测序仪对测序模板和引物的要求．南京医科大学学报，(3)：377

马富玲，畅继武，王林．2002．应用全自动 DNA 测序仪测定人胰岛素 cDNA 碱基序列．天津医科大学学报，(3)：378～379

王智，冯蕾，刘智广．1999．373A 型 DNA 测序仪的应用体会．细胞与分子免疫学杂志，(2)：69～70

第二十六章　高效液相色谱仪

液相色谱是指流动相为液体的色谱技术，它在经典的液体柱色谱分析的基础上，引入了气相色谱的理论，在技术上采用高压泵、高效固定相和高灵敏度的检测器，实现了分离速度快、分离效率高和操作自动化的要求，这种柱色谱技术被称为高效液相色谱法（high performance liquid chromatography，HPLC），相应的仪器则被称为高效液相色谱仪。图 26-1 为贝克曼 System Gold 高效液相色谱外观图。高效液相色谱又称为高压液相色谱、高速液相色谱或现代液相色谱，是 20 世纪 60 年代末 70 年代初发展起来的一项新颖快速的分离分析技术。高效液相色谱仪，由于其设备简单，操作方便，条件温和，分离效率高并不易造成分离物变性等优点，近 40 年来，高效液相色谱作为色谱分离法的一个分支，在分离酶等生物活性蛋白质以及多肽、核酸、多糖等生物大分子物质的研究中起着非常重要的作用，同时，高效液相色谱技术以它操作方法和条件的多样性使其适合于多种生物物质的分离、提纯，已成为生物化学和分子生物学领域，以及生物工程、基因工程等下游产品分离纯化的有效工具。

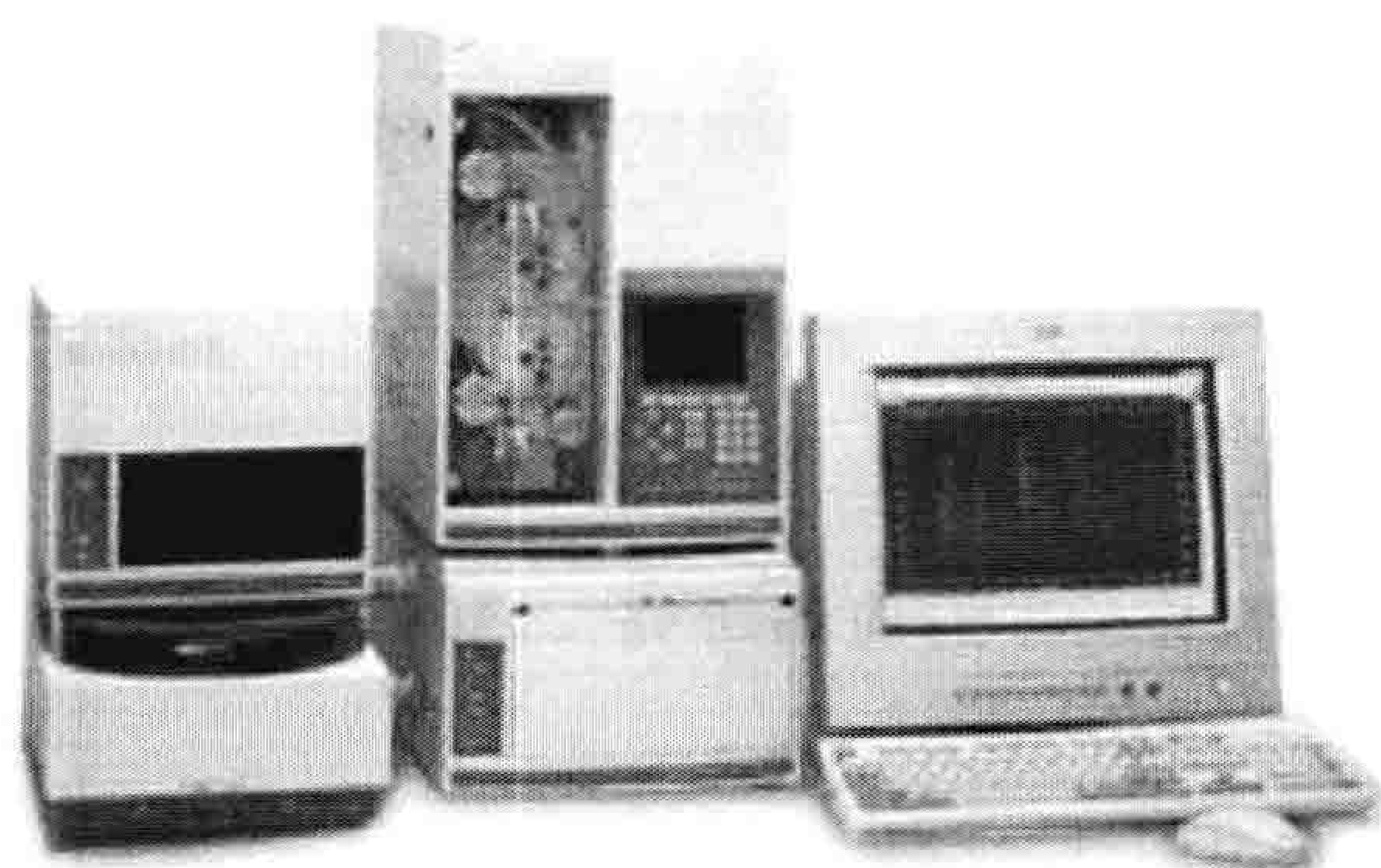


图 26-1　贝克曼 System Gold 高效液相色谱仪外观图
（来自 www.bio-equip.com）

第一节　基本原理与基本概念

液相色谱（liquid chromatography，LC）是指流动相为液体的色谱法的总称。在液相色谱中，采用颗粒十分细的高效固定相，并采用高压泵输送流动相，全部工作通过仪器来完成，这种色谱法就称为高效液相色谱法。

一、基本概念

（一）保留值

样品（或溶质）在柱内保留或滞留的能力可以用保留值来描述，这是色谱过程的基本热力学参数之一。在相同的操作条件下，不同物质有各自固有的保留值，这一特征是色谱定性的基本依据。保留值有不同的表示方法，在高效液相色谱中，主要的表示方法有以下几种。

1. 保留时间（t_R）和保留体积（V_R）

从开始进样到柱后开始出现样品的浓度极大值所需的时间为保留时间用 t_R 表示。

在这段时间内冲洗剂（流动相）流过的体积称为保留体积，用 V_R 表示。一般地，$V_R = t_R \times F$，其中 F 表示冲洗剂的体积流量，单位为 ml/min。

t_R 与固定相和流动相的性质、流动相的量、流速、柱体积和柱温有关；而当其他条件不变时，V_R 不受流速影响。

2. 调整保留时间（t'_R）和调整保留体积（V'_R）

保留时间和保留体积随柱体积和填料的孔隙度而变化，所以就提出了扣除掉“死时间”和“死体积”的调整保留时间和调整保留体积的概念。

3. 容量因子（k'）

容量因子 k'是一种广泛使用的保留值表示法。一般来说，容量因子只和溶质在固定相和流动相的分配性质、柱温和相空间比（即固定相和流动相的体积比）有关，与柱尺寸和流速无关。某物质的 k' 定义为在分配平衡时该物质在两相中绝对量之比，而平衡常数 K 为平衡状态下，物质在两相的浓度比。

（二）塔板理论

Martin 在 1941 年提出色谱的塔板理论，把色谱柱比拟成蒸馏塔。从统计结果看，在某一段柱长范围内溶质在固定相和流动相之间达到分配平衡，这段柱长就相当于一个理论塔板的高度（HETP 或 H），并认为当色谱柱的理论塔板数足够大时，柱内溶质谱带的浓度分布遵循高斯方程。虽然塔板理论并未反映色谱过程的本质，但是却形象地描述了这个过程的主要特征。

（三）分离效能总指标 K_1 和分离度 R

色谱过程的根本目的是实现多组分的分离。要分离得好，需具备两个条件：色谱峰窄与峰间距离大。前者可以通过提高柱效来解决，而后者则需要通过改变流动相和固定相之间的选择性来完成。两峰间有一定的距离，这是分离的必要条件，但是否分离得开，以及分离到什么程度，则取决于色谱峰的宽窄程度。分离效能总指标 K_1 或分离度 R 就是用来描述两峰分离程度的参数，两者的关系为 $K_1 = 1.699R$ 或 $R = 0.59K_1$。

（四）谱带扩张

在色谱系统中，谱带扩张可以分为柱内和柱外两部分。柱内谱带扩张的诸因素对柱内谱带加快效应 H 的影响可以归纳为：H 随填料粒度的减小而减小；在一定范围内流速小有利于提高柱效；减小冲洗剂黏度或提高柱温有利于减小 H 值；较小的样品分子 H 值较小。

柱外扩张又称为“柱外效应”，是指从进样点到检测池之间除柱子外的所有死空间，如进样器、连接管、接口和检测池等，这些都会导致色谱峰加宽，柱效下降。

（五）渗透性

渗透性（K）表示流动相通过柱子的难易程度。在 HPLC 中，由于使用液体流动

相，其黏度远比气体流动相大，填料粒度又很细，因而为了保证柱子在较低的压力下正常操作，总希望渗透性可以大一些。

二、定性分析和定量分析

（一）定性分析

当样品已知时，从高效液相色谱柱分离出来的组分，一般采用比较保留体积 V_R 或保留时间 t_R 的方法进行分析。当 HPLC 的分析条件（固定相和柱子尺寸、流动相种类和组分、流量、柱温）一定时，其同一物质的保留体积和保留时间相同，然后与标准物的保留时间及保留体积比较就可以推测出是什么物质。但需要注意，有时两项指标相同并不能保证它们就是同一种物质。因此需采用改变容量因子的比较方法，明确保留时间和碳的数目的关系并对比同一保留时间物质与标准物质光谱图来进一步确认。

（二）定量分析

高效液相色谱的定量方法与气相色谱法相同，检测器产生的信号大小（如峰面积 A_i）与进入检测器等的组分的量（m_i）成正比。即

$$A_i \propto m_i$$

$$A_i = S_i m_i$$

$$m_i = A_i / S_i$$

式中：S_i 为相应值，表示单位重量（体积）的组分代表的峰面积。

因此，在定量分析时要进行下列几个步骤的工作：准确测定峰面积，求出相应值（S_i），选择定量计算方法。高效液相色谱定量方法包括有峰面积归一化法、校正峰面积归一化法、内标法和外标法等。

1. 峰面积归一化法

这是最简单的定量方法，它是根据色谱图上出现的峰面积百分数求出峰成分的百分含量。

2. 校正峰面积归一化法

一般情况下，一种类型的检测器对不同类型化合物的响应值是不同的，为使信号真正地反映出各成分的真实含量，必须对响应值进行校正，即在适合的分离条件下测定已知浓度的标准品，求出各成分的响应因子。测定的成分最好选择能在一定分离条件下充分分离的成分。

3. 内标法

在实际样品中加入绝对不存在的内标物，首先用与校正峰面积归一化法相同的方法，求出被测成分标准物及其内标物的校正因子，然后测定样品中的被测成分。用这种方法即使有萃取、浓缩等前处理过程，也可以减少误差，提高定量分析精度，故被广为

使用。

改变被测成分标准物 i 和内标物 s 的重量比，从色谱图上分别得到各组分的峰面积，做出检测曲线，从而获得待测组分的浓度值。

4. 外标法

此方法又称为绝对检测法，在有被测成分的标准物的情况下使用。此方法是通过比较标准样的峰与样品中同一成分的峰面积绝对值进行定量分析的。

用不同含量的被测物标样（F_i）和所得到的峰面积（A_i）作检测曲线，从未知样的峰面积就可求出样品的含量 c_i%。

三、分离原理及适用范围

高效液相色谱按照其分离机制不同，可以分为 4 种类型：液-液分配色谱、液-固吸附色谱、离子交换色谱和空间排阻色谱。

（一）液-液分配色谱

液-液分配色谱是以液体作为流动相，另一种液体涂渍在载体上作为固定相。从理论上讲，在液-液分配色谱中的流动相和固定相应互不相溶，并存在一明显的分界线。样品溶于流动相后，在色谱柱内经过分界面进入固定液（即固定相）中，借助样品组分在固定相和流动相之间的相对溶解度的差异，使溶质在两相之间进行分配。液-液分配色谱分配现象与气-液色谱和液液萃取的机制相似。液-液分配色谱根据固定液和流动液的极性不同可分为正相液-液色谱和反相液-液色谱两种。

（二）固液吸附色谱

固液吸附色谱以液体作为流动相，以活性吸附剂作为固定相，分析的样品分子在吸附剂表面的活性中心产生吸附与洗脱过程，分析样品并不进入吸附剂内。

固液吸附色谱主要是利用固定相对样品分子吸附作用的不同来分离样品的。固液吸附色谱中，在固定相表面产生了溶质分子和固定相之间相互作用，这种作用表现为溶质分子和流动相（溶剂）分子对固定相表面发生竞争吸附现象，如果溶剂分子吸附性更强，则被吸附的溶质分子将相应地减少。

（三）离子交换色谱

离子交换色谱是以液体作为流动相，以人工合成的离子交换树脂作为固定相。离子交换色谱是基于离子交换树脂上可电离的离子和流动相中具有相同电荷的溶质离子进行可逆交换，从而依据这些离子对交换剂具有不同的亲和力而将它们分离。根据离子的性质可将离子交换色谱分为阳离子交换色谱和阴离子交换色谱。一般地，凡是在溶剂中能够电离的物质通常都可以用离子交换色谱法进行分离。

（四）空间排阻色谱

空间排阻色谱法也叫凝胶渗透法，凝胶过滤法或排斥色谱。这种方法 1950 年以前

就开始应用，并由于其可以测量较广范围内的分子质量分布而受到很大重视。空间排阻色谱（又称为排斥色谱）的机制类似于分子筛效应，它是以液体作为流动相，而以不同孔穴的凝胶作为固定相的。

空间排阻色谱的色谱柱内填充的凝胶具有一定大小的孔穴，并通常是化学惰性空间栅格网状结构。当样品进入色谱柱后，随流动相在外部间隙以及凝胶孔穴旁流过。这样，体积大的分子不能渗透到凝胶孔隙中而被排阻，因而较早的冲洗出来，中等大小的分子产生部分渗透作用，而小分子则可以渗透到孔隙中并通过一个平衡过程被较晚地冲洗出来，从而通过分子大小的不同达到分离的目的。对同系物来说，洗脱体积是分子质量的函数，而洗脱次序决定于分子质量的大小。

液相色谱根据固定相的形状可分为平板色谱和柱色谱，前者有纸色谱和薄层色谱，后者有离子交换色谱等。高效液相色谱根据其固定相分离机制的不同，还可分为吸附色谱（adsorption chromatography）或液固色谱（liquid-solid chromatography）、分配色谱（partition chromatography）、离子交换色谱（ion exchange chromatography）、凝胶色谱（gel chromatography）或称为排斥色谱（exclusion chromatography）等。这 4 种方法在实际应用中是相辅相成的，如图 26-2 所示。对于分离相对分子质量大于 10 000 的物质来说，虽然现在已经可以使用反相分离色谱，但主要使用的仍是排斥色谱；对分子质量相对较低的离子化合物，广泛使用的是离子交换色谱；而对于极性较小的非离子化合物以及同系物的分离，分配色谱一般比较适用；而吸附色谱则最适合分离非极性物质、结构异构以及从脂肪醇中分离脂肪族碳氢化合物等。

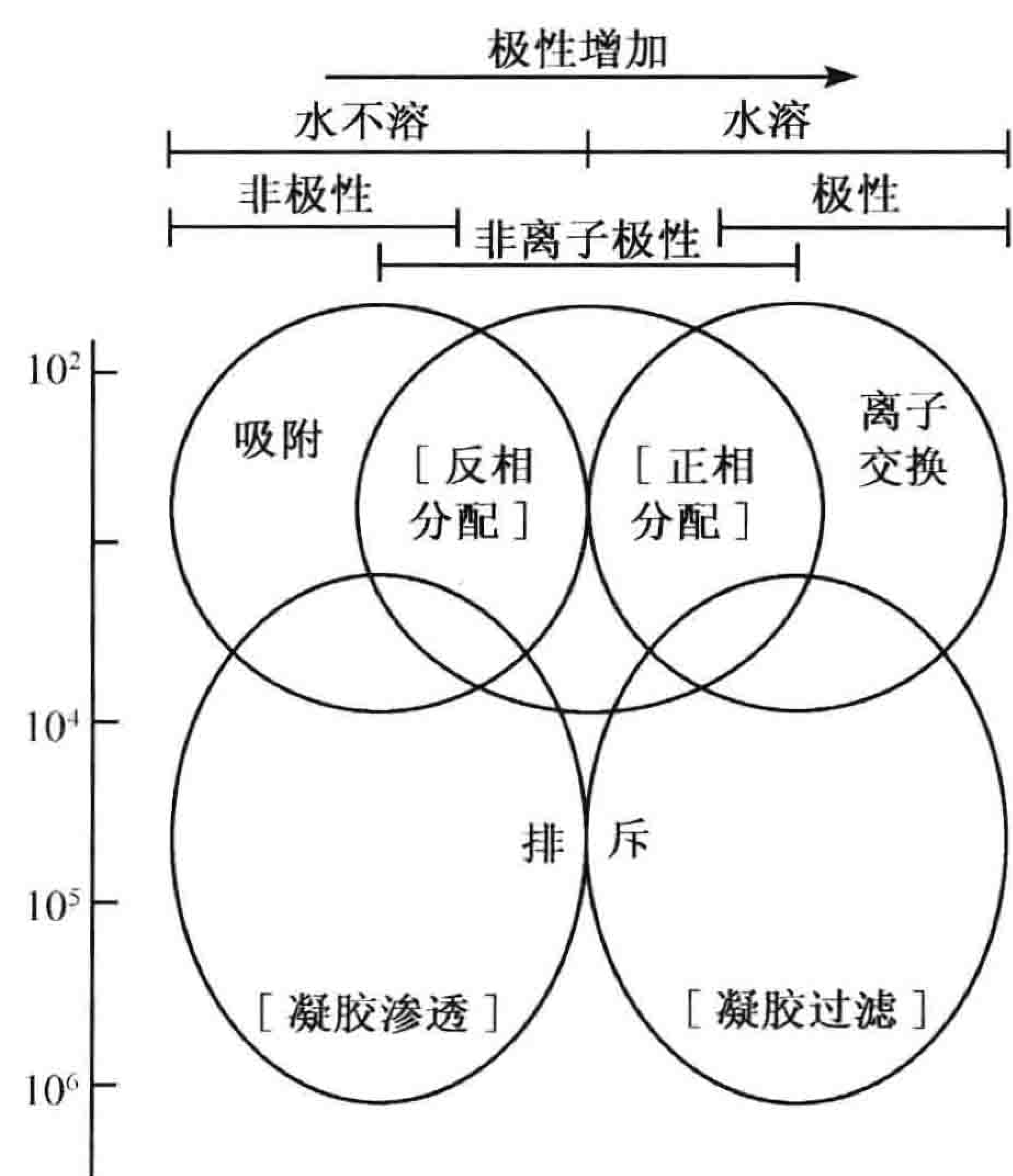


图 26-2 几种液相色谱的应用

虽然每种分离方法都具有较高的分离性能，但每种分离类型都不是万能的，它们都有一定的适应对象。在为某一分离任务选择分离方法时，一般可以从样品的分子质量范围、溶解度、分子结构等方面着手并结合实际情况进行选择。

第二节 组成和性能

经典液相色谱到高效液相色谱理论上的发展，在仪器装置上对高效能的固定相、高压泵以及先进的高灵敏度检测器等方面提出了新的要求，同时仪器装置的改进又进一步推动了高效液相色谱理论的完善和发展。目前，高效液相色谱装置的性能和质量都发展到了比较成熟的地步，并出现了适合于不同使用目的的多种类型的高效液相色谱仪。高压泵的压力可高达 $700kg/cm^2$，检测器也从固定单波长紫外检测器发展到可变波长紫

外-可见光检测器、二极管阵列检测器、红外检测器、荧光检测器、示差折光检测器、电导检测器以及质谱和核磁共振检测器等多种类型的检测器，使仪器的灵敏度和使用范围大大提高，不仅如此，各种附属设备如自动进样器、梯度洗脱装置和自动部分收集器等的应用也日趋完备。目前有多家公司生产多种型号的高压液相色谱仪，如惠普公司、贝克曼（Beckman）公司黄金系统 HPLC、瓦里安（Varian）公司 LC Star System 系列、日立 Hitachi 公司 L-7000 系列、PE Biosystems（Perkinelmer）的 BioCAD 700E 以及岛津（SHIMADZU）公司 LC-10Avp 系列等。

一、仪器的组成与结构

一般来说，高效液相色谱仪总体可分为 4 个部分，即进样系统、高压输液系统、分离系统和检测系统。此外，还有一些附属装置，如梯度洗脱装置、自动进样系统以及自动收集系统等，可以根据特殊要求选用。图 26-3 为高效液相色谱仪的结构示意图，其工作流程为：首先，通过高压泵将储液器中的溶液经进样器送入色谱柱中，然后从检测器的出口流出。当欲分离的试样从进样器进入时，流经进样器的流动相将其带入色谱柱进行分离，然后依先后顺序进入检测器，进入检测器的信号被记录下来，得到液相色谱图，检测器的流出液流入废液瓶或部分收集器。

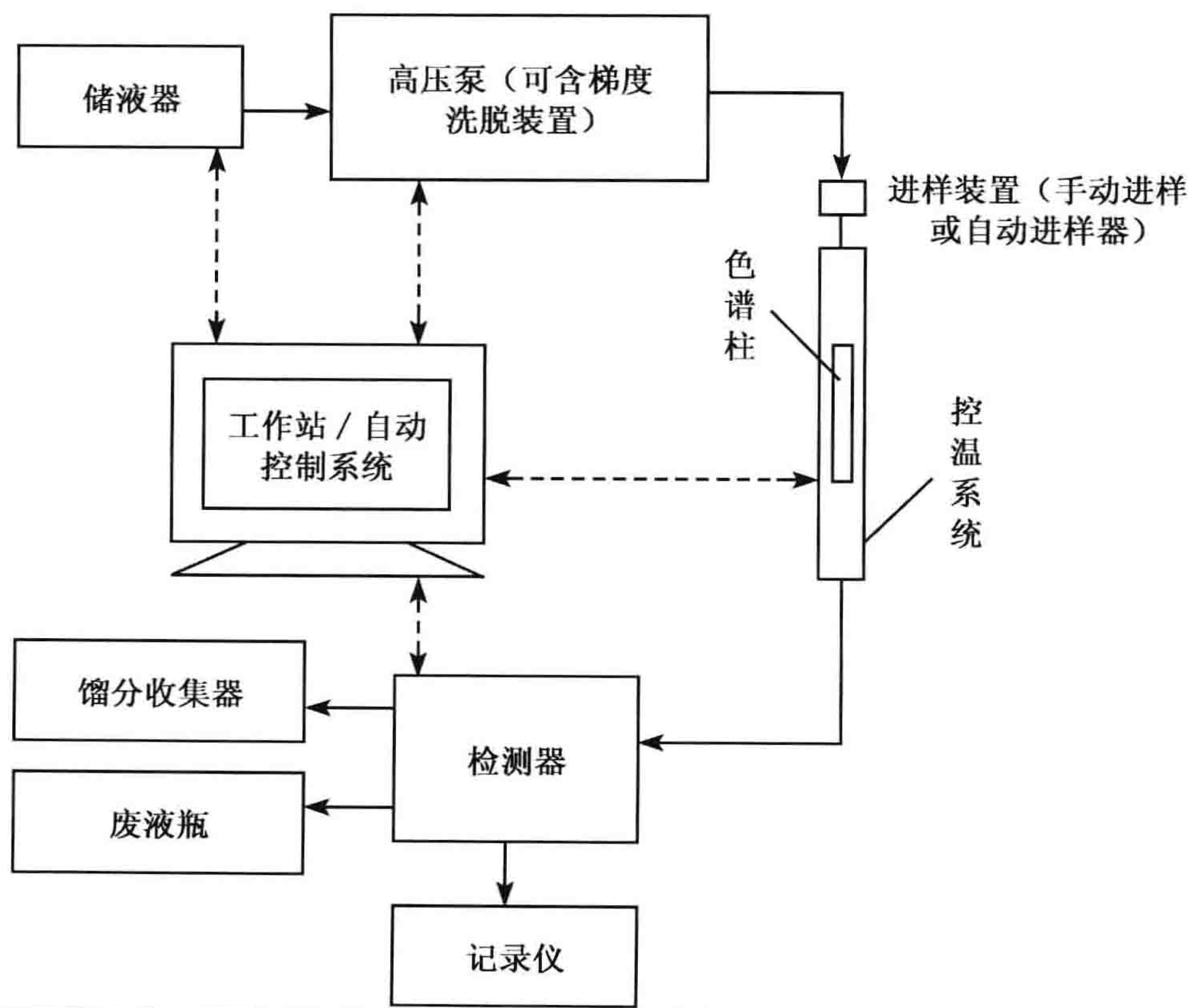


图 26-3 高效液相色谱仪结构示意图

（一）高压输液系统

高压输液系统的核心部件是高压泵。高压泵按照其操作原理可分为恒流泵和恒压

泵。恒流泵的特点是在一定的操作条件下，输出的流量保持恒定，与色谱柱等引起的阻力变化无关，常用的有往复泵和注射泵。恒压泵与恒流泵不同，它能保持输出压力恒定，而流量则随色谱系统阻力的变化而变化，这样会导致保留时间的重现性差，目前已经较少应用。

一般来说，理想的流动相供输系统应该保证一切所需流动相能够恒定流动，使得从己烷到水的各种流动相可用于吸附色谱和键合相色谱，为离子交换色谱随时提供各种强度或pH的缓冲溶液。当然，完全达到这些条件是做不到的，但很多情况下可以得到良好的近似状态。由于理想流动相供输系统的要求，高压泵应该具有有足够的输出压力，使流动相能顺利通过颗粒很细的色谱柱，通常其压力范围为25～40MPa；流量输出恒定，其流量精度应该在1%～2%；输出流动相的流量范围可调，对分析仪器一般为3ml/min；制备仪器为10～20ml/min；压力平稳，脉动小，这些指标已有众多型号仪器可以满足要求。

（二）进样系统

液相色谱的进样装置对柱效有很大影响，它必须要保证在高压恒流状态下瞬时将样品注入层析柱内填料的顶端中心位置，如果注入到填料上端的流动相中，就会使溶液中的溶质在扩散后才进入柱中的填料，这样柱外的谱带扩宽现象会造成柱效显著下降，尤其是用微粒填料时，更为严重。柱外的谱带展宽通常发生在进样系统、连接管道和检测器中，所以设计一个好的液相色谱仪应该尽量减少这3部分的体积。

进样装置分为手动进样器和自动进样器，而一般的进样方式有4种，即直接注射进样、停流式进样和阀门式进样和自动式进样4种。

1. 直接注射进样

在层析柱的上端装有一个耐压的、耐有机溶剂的弹性隔膜，进样时直接用注射器刺穿隔膜将样液送入到层析柱顶端。这种加样方式的死体积几乎为零，其优点是操作简便，并可获得较高的柱效，但这种方法不能承受高压（柱压在10MPa以上），且重复性较差，因此目前使用得越来越少。

2. 停流式进样

在高压泵停止供液、体系压力下降至接近零的情况下，将试样直接加到柱头，然后再重新启动液压泵进行分离。这种方法产生的死体积小，能够得到较高的柱效，但是这种方法操作不方便，且在停泵和重新启动泵的时候会导致液压系统产生脉冲，出现脉冲峰，从而重现性也较差。

3. 阀门式进样

这是高效液相色谱普遍采用的一种进样方法，能在高压输液的条件下将样液送入到柱内。这种进样方法的优点是在加样时不会因加样而影响泵连续工作，进样器耐高压，进样量准确，任意可调，重复性好，操作方便，易于自动化；缺点是在阀门接头和连接管的位置会产生少量的死体积，由于样液不是直接加到层析柱的顶端，柱效相对于直接

注射进样法略低些。阀门式进样器主要有 2 种形式，一种是四通阀进样器，这种阀在阀门内部设有 4 个管路通道，分别用于采样和进样；另一种是六通阀进样器，在阀门内部设有 6 个管路通道，分别用于采样、进样和排除废液。

四通阀进样器是一种内量管式的定体积的进样阀，进样量准确，能够进行微量分析，具有较好的重现性。六通阀进样器是最常见的一种进样方式，集中了阀门式进样器所有优点。这种进样方式是在泵连续工作的条件下，将六通阀的阀柄转向采样的位置，此时加样系统与高压层析系统流动相的路径断开，用微量进样器将样液在常压下推入六通阀的定量管中，然后将转动阀柄使其对准进样位置，此时加样系统与高压层析系统流动相的路径接通，样液立刻被高压泵的溶液带入到柱内，完成一次加样。如图 26-4 所示，样品流经 2→3→6→1→4→5 完成样品在定量环的装载，5 路未与色谱柱相通，多余样品从 5 中排出，当阀柄旋转后，5 路与色谱柱流路相通，流动相沿经 2→1→4→3→6→5 流入色谱柱，如图 26-5 所示。

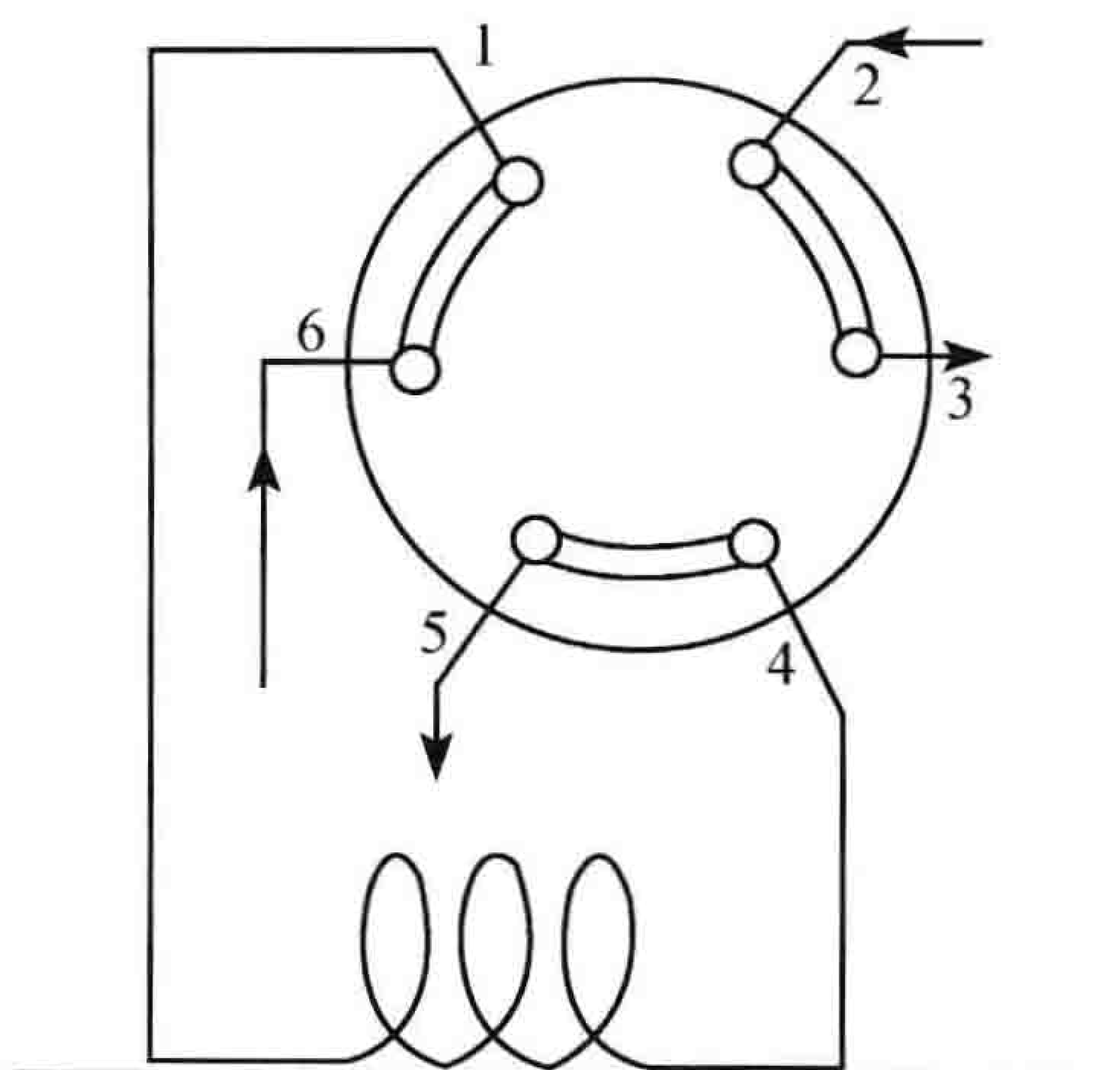


图 26-4　六通阀装载样品流程图

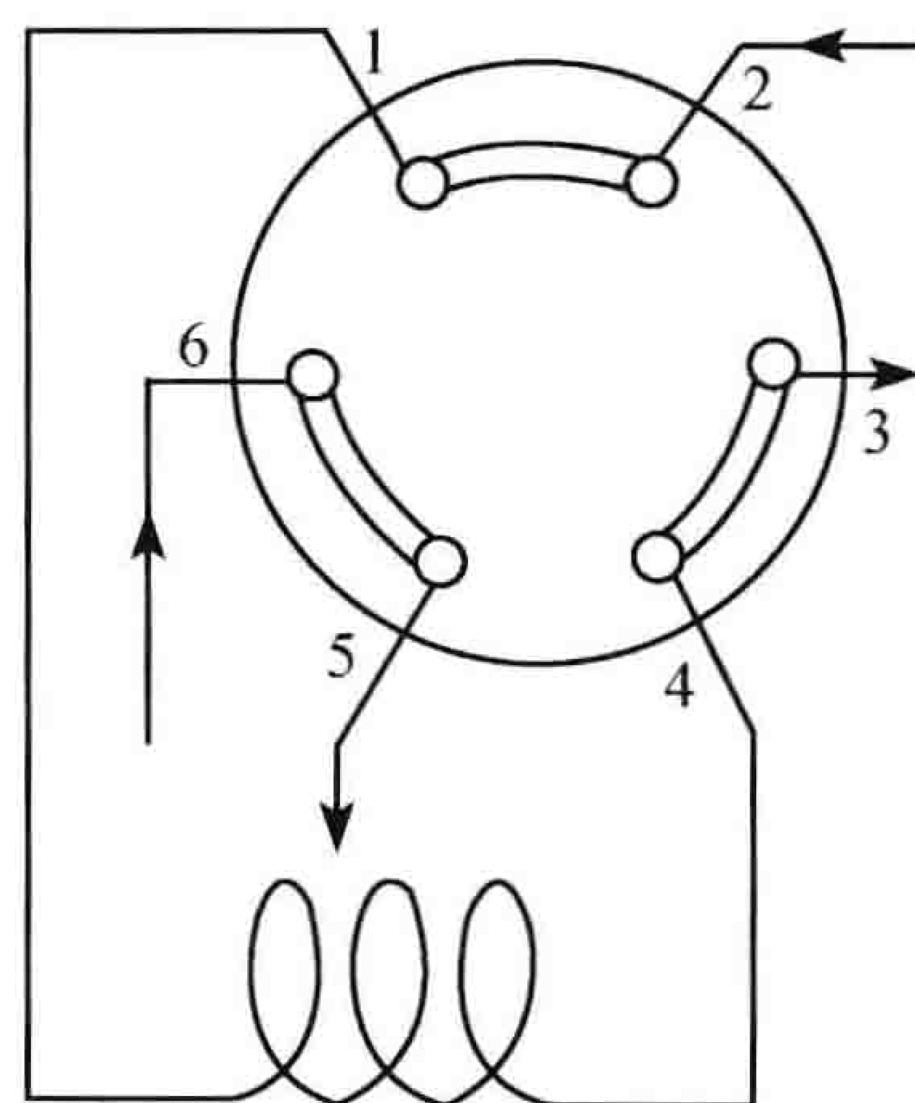


图 26-5　六通阀注入样品流程图

4. 自动式进样

自动式进样方式多用于在高压冲洗的条件下，将样品定量地送入柱内。这种进样方式是通过外设一个蠕动泵提供一定的液压，微机控制一个六通阀来进行采样、进样和清洗柱等各个环节。操作时只需准备好样液等基础溶液即可。这种进样方法的优点是耐高压，能在高压下长期工作，加样准确，重现性好，可连续进样，尤其适合于加样体积较大的样液（图 26-6）。

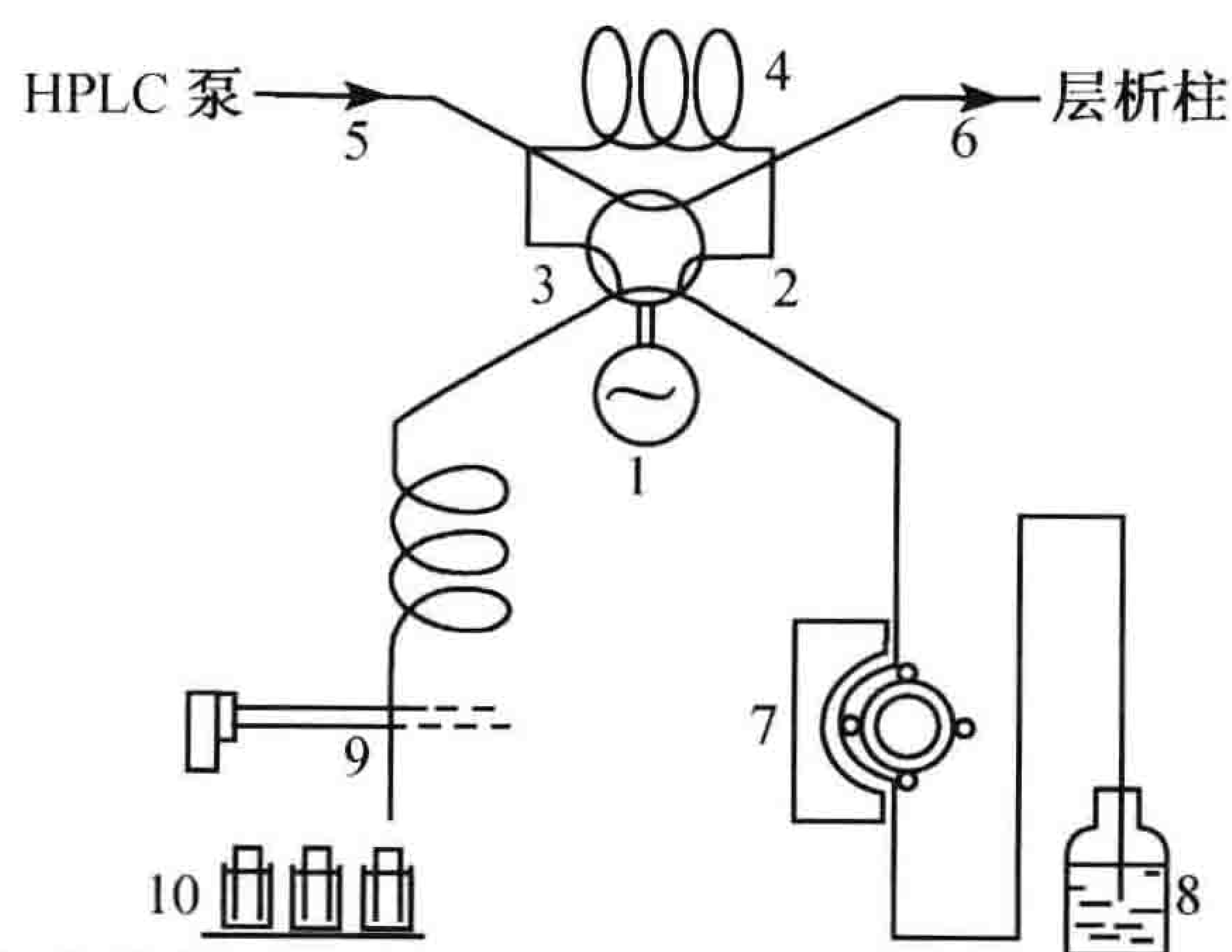


图 26-6　自动式进样器示意图

对于进样系统和色谱柱，无论柱头的压力多大，所需样品都应该能够不经稀释注入柱头，并在样品不发生分散的情况下完成所需的分离。大多数的进样系统都可以较好地解决第一个要求，而第二个要求则由于色谱过程的本质而难以实现，但凭借对柱填充物、柱本身以及柱填充方法进行小心的设计和制作，也可对所希望的分离创

造出好的色谱条件。

（三）色谱柱

色谱柱由柱管、末端接口、卡套（或称密封圈）和过滤筛网等组成。

色谱柱的设计（包括柱型、结构、填料和装填方法）或称柱技术（column technology）对高效液相色谱的发展和分离效能起着关键性的作用。高效液相色谱柱可分为3种类型：内径小于2mm的称为细管径柱或微管径柱，内径为2～5mm范围的是常规高效液相色谱分析柱和内径大于5mm的一般称为半制备柱或制备柱。

细管径柱的主要优点是节省溶剂和灵敏度高。当然，由于柱体积越来越小，柱外效应的影响也就越来越显著，为了减缓这种情况，更小池体积的检测器，更小死体积的柱接口和连接部位以及进样设备和小流量泵都发展起来。目前已经有适合于内径为2.1mm和1.5mm细管径柱的商品仪器问世；而其微管径方面，小于20μm的开管柱和0.3mm粗的填充毛细管柱的研究工作也是一个很活跃的研究领域。

高效液相色谱柱一般大都为不锈钢，耐溶剂、水和一定范围的缓冲溶液。国际上多使用耐较宽pH范围腐蚀和抗氧化的316和314号不锈钢作柱管和接口，可以延长色谱柱的寿命。由于管壁效应的影响，一般高效液相色谱柱内壁应当经过精密加工、光滑、以消除沟流，达到所谓“镜面”精度。通常使用的制备柱由高压不锈钢柱和低压大直径的玻璃柱。目前设计了一种新的锥形玻璃柱，适合生物色谱，生物色谱柱中多采用聚合物介质，如400nm的大孔聚合物填料。

（四）检测系统

液相色谱的检测器有2类，一类是溶质性检测器，它仅对被分离组分的物理或物理化学特性有响应，属于这类检测器的有紫外、荧光和电化学检测器等；另一类是总体检测器，它对试样和洗脱液总的物理和物理化学性质有响应，属于这类检测器的有示差折光、介电常数检测器等。用于液相色谱中的检测器，除应该具有灵敏度高、噪音低、线性范围宽、响应快、死体积小等特点外，还应对温度和流速的变化不敏感。为了将谱带展宽现象减小到最低，检测池的体积一般小于15μl，当接微型柱时应该小于1μl。仪器常可选配的检测器有：紫外检测器、红外检测器、荧光检测器、示差折光检测器、电导检测器、质谱检测器和核磁共振检测器等。

凡是分子中含有—C=O、—C=S、—C=N—等共轭双键的化合物均可使用紫外检测器，它是蛋白质、核酸及肽类等生物大分子常用的检测器。紫外检测器主要有单波长、双波长及连续可变波长等几种，检测波长在200～400nm。具有灵敏度高、线性范围宽、受温度和流速变化的影响小、仪器性能稳定、操作简便、不破坏被分离样品等优点。检测灵敏度一般可达到10^{-12}～10^{-9}g左右。

红外检测器分子质量大小对响应值的影响很小，并且易于制成能加热的检测池，在150℃的高温下还能稳定工作，因此红外检测器不但适合于有机化合物和有机合成药物的检测，而且也适宜于生物大分子的检测。红外检测器使用的波长在1000～3000nm，灵敏度可达到10^{-8}g。

荧光检测器可有选择地检测溶液中的荧光物质，灵敏度高达 10^{-17}～10^{-11} g。凡是含有对称性共轭体系的分子和不能产生强离子结构的化合物都能发射荧光，有些不产生荧光的物质，也可以通过标记荧光物质进行检测。这种方法称之为间接发射荧光。荧光检测器也特别适合于痕量分析。

示差折光检测器主要有偏转式和反射式两种。作为通用型检测器，其灵敏度不高，一般在 10^{-7} g 左右。示差折光检测器对温度变化极为敏感，常用于无紫外吸收的生物分子和糖类化合物的检测。

电导检测器适用于检测离子型化合物，也可用于非水系统的流动相。是采用固体微电极（如铂电极）和参比电极（氯化银电极），测定痕量活性物质的微电流，还可检测氧化还原物质。但这种检测器对温度和流速的变化十分敏感，电导检测器灵敏度不高，一般在 10^{-6} g 左右。

当被测物质的分子在高速电子流的撞击下电离成质子和电子时，检测其质荷比。在一定条件下，溶液中的溶质的含量与产生的质荷比成正比。质谱检测器（mass spectrometer）的灵敏度非常高，一般可达到 10^{-19} g 左右，常用于痕量分析。

分子中的原子核在高磁场中，经辐射能照射后产生核磁共振信号，通过试样核磁共振的变化来进行检测。核磁共振检测器的灵敏度非常高，一般可达到 10^{-19} g 左右，常用于痕量分析。核磁共振检测器（nuclear magnetic resonance spectrometer）尤其适于活性物的检测。

理想的检测器应能检测出流动相中含有的单一分子，在整个浓度范围内产生线性响应，而不引起柱外扩散，具有非破坏性和一致性，产生可重现的稳定输出。这些条件是无法同时达到的，只能在一定范围内选择接近最优的检测器。液相色谱发展中，检测器的改进一直都是研究的热点。

（五）附属系统

液相色谱仪的附属装置依使用者的要求而异。通常它们包括过滤器、脱气、梯度洗脱、再循环、恒温、自动进样、馏分收集以及处理等装置。这些装置一般均属选用部件，使用得当会大大增加仪器的功能和效率。

二、仪器的种类及不同型号仪器性能特点

不同厂家生产的仪器具有不同的风格，对于 HPLC 而言，一般关注的是泵的最高压力、流量范围、流量控制精度、检测器的灵敏度、分辨率和重现性等关键性能指标。PE公司的灌注层析系统 BioCAD700E 泵流量范围宽广可达 0.2～100ml/min，集传统的数台仪器于一体，可实现一机多用，具备柱串联功能，可进行串联分离分析，产品峰可实时跟踪，软件上具有在线肽谱分析等多维色谱技术，所有参数全部在线检测，可具有自装柱功能可自装填柱子，大大降低成本。

贝克曼公司（Beckman）的 System Gold 高效液相色谱仪呈分体式排布，泵压力可达 0～6000psi，可配有有紫外/可见光检测器（190～700nm）及二极管阵列紫外/可见光（190～600nm）检测器。

美国戴安（DIONEX）公司液相色谱仪 SUMMIT HPLC 系列的自动进样器性能好，可靠性高，色谱信息管理软件功能齐全，而且具有 SQL 数据库。

Waters 高效液相色谱系统仪高压泵流速精度高，机械性能好。

日本岛津和日立生产的高效液相色谱仪排布上都属于积木式结构，灵活性与扩展性强，可组成离子色谱、氨基酸、GPC、有机酸、糖等多种分析系统，尤其在氨基酸成分分析上具有氨基酸分析仪的功能。

三、有关附件的作用及其配置

（一）过滤器

通过过滤器除去溶液或溶剂中的不溶物，防止其堵塞管道和柱头。常用的过滤器有两种，分别适用于过滤水溶液和有机溶剂，称为水相滤膜和有机相滤膜。

（二）脱气装置

在常压下配制的溶液或溶剂总是溶有少量气体分子，它均匀地分布在溶液中，在高压条件下就会集结产生气泡，气泡所产生的脉冲直接影响柱压的稳定，使柱效下降。因此必须通过一个脱气装置排除在常压下配制的溶液或溶剂中的空气。常用的脱气方法有两种，一种是真空脱气，在负压下将气体分子抽出来，适宜于水溶液的脱气；另一种方法是利用超声波脱气，利用超声波与溶剂分子产生的共振使气体分子释放出来，适宜于有机溶剂和水溶液的脱气。

（三）梯度洗脱装置

这种洗脱方式是将两种或两种以上不同性质但可以互溶的溶剂，随时间改变而按一定比例混合，以连续改变色谱柱中淋洗液的极性、离子强度或 pH 等，从而改变被测组分的相对保留值，提高分离效率，加快分离速度。主要应用于分离分配比相差很大的复杂混合物。梯度混合方式分为泵前混合和泵后混合。泵前混合是将溶液先混合再经高压泵送入层析柱，操作简单，但容易产生气泡；泵后混合不易产生气泡，但操作复杂。

（四）循环系统

循环系统是专门为在同样的条件下将两个相邻的但没有完全分开的峰再进行分离而设计的一种装置。相当于通过延长柱长的方法来增加理论塔板数，提高分离度。最简单的循环系统是在柱的出口末端连接一个泵，将从末端流出来的组分重新送入柱内进行分离。由于这是一个密闭的循环系统，经过几次循环，原来是重叠的组分就可以分开。如果在检测器的后面设一个多通道电磁阀，还可以把已分开的组分收集起来，未分开的组分进入循环系统进行重新分离。虽然循环系统对于性质相近的、一次难以分开的化合物是非常有效的，但是由于循环系统循环用的管道所占用的空间属于填料床体积以外的死体积，对峰有扩宽的作用，每循环一次就要扩宽一次，循环的次数越多，峰扩散就越严重。因此，为了减少峰的扩宽循环系统的管路应尽可能短，循环次数尽可能少。目前循

环系统多用于大量样品的制备上，而在分析柱上并不多见。

（五）部分收集器

高效液相色谱是在无人看管的状态下收集经柱分离后流出物的各组分，尤其在制备层析中收集器是非常有用的辅助设备。对于组分较多的化合物的收集，一般用自动收集器。自动收集器种类很多，其中受主机控制的收集器要在检测器后面安装一个三通阀，按照记录仪上绘出的层析峰的起止信号，并考虑延迟时间，确定收集的开始时间和结束时间，转动三通阀以完成分馏收集。自动收集器的收集方式有 3 种，即按照保留时间收集、按保留体积收集和按分离组分收集。

（六）信号记录系统

记录仪是将检测到的信号随时记录下来，记录的方式一般有单笔记录、双笔记录和计算机记录。工作站可以在线记录数据并可对数据进行多项处理。

第三节　操作使用

以 Beckman 公司的 System Gold 为例，介绍该类仪器的操作使用。

一、基本操作

（一）仪器的安装

仪器的安装包括硬件安装和软件安装 2 个方面，硬件按照仪器的配置安装完后，需要将工作站装入计算机，这一步骤一般由厂家技术人员完成。

（二）仪器的使用

1. 系统的启动

软件安装完毕可开始如下启动程序，不同厂家仪器程序设计风格截然不同。System Gold 在电脑电源接通约 1min 后屏幕上显示标志/版权-序号等信息；几秒钟后，屏幕显示初始配置，包括 HPLC 系统中的各个部件配置符号。

2. 系统内的移动

在黄金系统中的所有屏幕的构成都比较相似，使用很少的指令就可由一个屏幕移动到另一个屏幕，主要方法包括：光标和鼠标的移动、选择菜单栏、主题词和下拉菜单以及退回前一屏幕和寻求帮助信息，此外还有转移至状态屏幕。

3. 在直接控制方式下建立系统

黄金系统操作的直接控制方式可改变显示屏幕上的每个系统参数，而无需再到每个部件的控制面板上进行这一操作，这些设置的指令会立即被执行。

在屏幕的初始配置中显示了与系统相连的部件，所有部件均可由黄金系统控制。Status and Control（状态与控制）屏幕是系统的主操作屏幕，分 4 个窗口显示，包括系统操作状态、色谱作图、色谱叠加、梯度作图及二极管阵列扫描。直接控制功能可对 HPLC 泵的流动相组成和流速的基本参数和压力单位进行设置；对检测器的波长，灯的开、关状态和预热、校正，基线归零等进行设定和执行；对自动进样器的样品瓶号位置、进样体积、进样方式、梯度滞后时间、进样阀的装载或进样、洗涤体积、冲洗体积等进行设定和执行。

该方式下还可建立状态显示。状态显示选择可进行 3 种类型的设置：选择合适的窗口、为色谱图选择显示时间轴、为色谱图选择吸收值标尺。

4. 在直接控制方式下检测样品

该方式下可实现基线监控，若显示基线太高，点击 AUTO ZERO 可实现自动归零。待基线稳定后运行样品，在黄金系统中，所有系统操作参数存在一个文件中，称其为一个方法。可以根据自己的意愿给该方法命名，一般用容易识别的名字命名。一个方法是通过可选择操作参数的方法编辑屏幕产生的。使用已产生的方法时，在启动前应将方法通过文件名调出并且输送到有关部件中，得到预期的操作参数。

如果使用带有接触开关的手动进样阀，在“装样”位置上，将样品注入进样阀，再将进样阀由装样（load）位置扳到进样（inject）位置。阀上的接触开关将启动方法和数据收集。若进样阀未配有接触闭合开关，则在扳动进样阀杆底同时点击“开始方法”（start method）也可启动方法和数据采集。

如果使用自动进样器进样，在证实自动进样器已经在直接控制屏幕进行合理的设置，同时样品瓶已放在样品转盘上以后，就可按下开始方法，开始进样和数据采集。样品运行时，色谱图可在状态与控制屏幕上观察，方法启动与屏幕上色谱图的出现有一个很小的时间间隔，这是因为检测器是以一批数据点的方式输入数据，色谱图则由同样大小的数据点来更新。当最后一个峰被洗脱出来后，色谱图完成。点击停止数据（stop data）或停止方法（stop method）即可中止数据采集。停止数据采集后，会根据 METHOD（方法）中设定的参数自动生成一份报告和色谱图。

二、仪器的例行保养和故障排除

（一）分析泵与输液系统

高压分析泵是高效液相色谱最重要的部件之一。分析泵的主要作用是通过等浓度或梯度浓度的方式在高压下将淋洗液经由进样阀输送到色谱柱内并对待测物进行洗脱。分析泵性能的好坏直接影响仪器结果的可靠性。一般地，高压泵有输出压力高、耐腐蚀、流量稳定以及密封性好和噪音低等特点。高压泵正常工作时，系统压力和流量稳定，噪音很小，色谱峰形正常。与之比较，在高压泵不能正常工作时，系统压力波动较大，产生噪音，基线的噪音加大，流量不稳并导致色谱峰形变差和出现乱峰。其原因分别叙述如下。

1. 淋洗液的脱气和泵内气泡的排除

仪器初次使用或更换淋洗液时，管路中的气泡容易进入泵内，造成系统压力和流量不稳定，同时分析泵马达为维持系统压力的平衡而加快运转造成噪音。另外，分析泵工作时要求能够提供充足的淋洗液，否则分析泵容易抽空，因此淋洗液瓶需要施加一定的压力（通常小于 35kPa）。对于一些容易产生气体的溶液如甲醇淋洗液，可先用真空脱气的办法除去溶液中大部分的气体，再在系统中用惰性气体（氦气等）在线脱气的方法处理。

对已经进入到泵内的气泡可以通过启动阀排除。具体方法是先停泵，用一个 10ml 的注射器在启动阀处向泵内注射去离子水或淋洗液，可反复几次直到气泡排除为止，然后再将泵启动。

2. 系统压力波动大，流量不稳定

系统中进入空气，或者单向阀的宝石球与阀座之间有固体异物，使得两者不能闭合密封，需卸下单向阀侵入盛有乙醇的烧杯用超声波清洗。同时，高压泵上的压力传感器是用来探测液体流动时的压力变化，并将其变化反馈给分析泵电路来调整马达的转速。压力传感器的故障也会引起压力波动，应检查传感器旋钮上的“O”型密封圈是否有磨损。

3. 漏液

泵密封圈变性后，在高压下会产生泄漏。泵漏液后，系统压力不稳定，仪器无法工作。泵密封圈属于易耗品，应经常检查并更换，许多仪器可配有漏液检测装置，可以提示泵的漏液情况。

4. 系统压力升高

当系统压力超过正常压力的 30% 以上时，可认为该系统压力不正常。一般压力升高可分为以下几种情况：保护柱的滤片因有物质沉积而使压力升高，需更换滤片；某段管子堵塞造成系统压力突然升高，需要逐段检查、更换；室温低于 10℃，系统压力会升高，需设法使室温保持在 15℃以上；由于溶液的黏度和密度变化，压力也会有变化；流速设定过高使压力升高，应按照色谱柱的要求设定高压泵的流速。

5. 系统压力降低或无压力

系统有漏液时，压力会下降。仔细检查各个接头是否拧紧。另外，当系统中有大量气泡存在，进入泵内形成空穴时，启动泵后系统无压力显示，也无溶液流出。为了避免这种现象，流动相的容器要加压（不大于 0.03MPa），并注意在初次使用或更换淋洗液时排除输液管内的空气。

6. 泵的维护

在泵的使用过程中，应适当加入淋洗液以避免溶液耗光，造成泵空抽。产生气泡后

应先停机，然后予以排除。特别要防止在无人的情况下，泵内进入气泡，泵为维持压力平衡而加快转速造成对马达内转子的磨损。防止泵内进气泡的最好方法就是对淋洗液瓶加压。在排净了流路中的气泡后，加压的系统基本上就不会再产生气泡。

（二）检测器常见故障

性能良好的检测器其基线噪音在较灵敏时可以保持很小，但随着输出灵敏度的进一步增强，检测器的噪音会逐渐增大。因此应注意避免为了提高检测灵敏度而将检测器的输出范围设置过于灵敏以防止基线噪音增大。不仅如此，气泡的存在也会使基线噪音增大，也应注意避免。

（三）色谱柱常见故障

1. 柱压升高

原因可能有：色谱柱过滤网板被玷污，需要更换，一般先更换保护柱进口端的网板，注意不可损失柱填料；柱接头拧得过紧，使输液管端口变性，因此接头不能拧得太紧，不漏液即可；PEEK 材料的管子切口不齐。

2. 分离度降低

色谱柱分离度降低可能与以下原因有关：系统有泄漏时分离度会降低；分离柱被玷污后柱容量因子 k'值变小；淋洗液类型和浓度不合适等。采用适当的分离方式并采用适当的样品前处理方式可以使分离度的下降减小。

3. 死体积增大

分离柱入口树脂损失造成死体积增大或树脂床进入空气使树脂床产生沟流均会使分离度下降。因此在使用中要注意色谱柱的 pH 适用范围，如果超出该范围分离度将下降。若分离柱入口处出现空隙，可填充一些惰性树脂球以减少死体积的影响。不仅如此，分离柱的出口和系统之间的连接应用内径较小的管子以减小柱效损失。

4. 保留时间缩短或延长

色谱峰保留时间的改变会影响待测组分的定性和定量分析，因为在色谱分析中稳定的保留时间对于获得准确、可靠的结果是十分重要的。一般可以采取应用经过脱气的水配制的淋洗液和将配好的淋洗液用氦气和高纯度的氮气保护起来的方法来减少这个问题的发生。

第四节　在生物化学和分子生物学领域中的应用

高效液相色谱的应用已经涉及了生命科学的许多重要领域。根据目前的发展，高效液相色谱能较理想地分离和分析生命科学领域有关的大分子和离子型物质、易变质的天

然产物，各种高分子化合物和不稳定化合物等。例如，蛋白质、核酸、氨基酸、多糖等大分子物质、极性类脂肪化合物、药类、农药、多环芳烃、合成聚合物、嘌呤和维生素等。

一、核苷和核苷酸的分离

随着对核糖核酸生物功能的认识和深入研究，它的分离和定量分析显得越来越重要。目前反相液相色谱已成为核苷和核苷酸比较理想的色谱分离方法。利用高效液相色谱对核苷和核苷酸进行分离和分析，多采用 C18 柱，其主要的影响因素包括了流速、pH、有机改性剂和柱温等。

二、氨基酸的分离和分析

在通常的高效液相色谱仪上可进行氨基酸的分离工作。应用 pH 梯度程序分析氨基酸可获得较高的分离度。由于操作条件灵活，与常规的氨基酸分析仪相比，HPLC 具有分离时间更短和分离度更高的优点。

三、蛋白质的分离和纯化

灌注快速色谱是近年来发展起来的一种蛋白质快速纯化技术。这种色谱在高速条件下运行，可以使流动相通过颗粒内部，明显降低了流动相溶质滞留现象，使柱效快速提高，在蛋白质的分离纯化的各种模式中得到广泛的应用。

此外，高效液相色谱还广泛应用在单克隆抗体、人体血清中脱脂蛋白质以及 α-淀粉酶等蛋白质的分离纯化工程中。

四、在生化分析和医学领域中的应用

高效液相色谱在生化分析和医学领域中一直都有重要的应用。例如，在体液中各种物质的分析、尿液中无机离子和有机酸的检测、糖类化合物和蛋白质的分析以及生物样品的制备等领域，高效液相色谱都发挥着极其重要的作用。

不仅如此，高效液相色谱联用技术的发展，使高效液相色谱的应用范围和检测灵敏度有了很大的提高。目前高效液相色谱还广泛应用于生物产品的污染和毒性分析、石油化工、卫生、环境保护和高能化合物等的生产和科研工作中。

第五节 高效液相色谱仪的进展和发展趋势

色谱法是几十年来分析化学中最富活力的领域之一，也是生命科学和制备化学中广泛应用的一种手段。高效液相色谱的发展趋势和进展也受到了许多关注，它的发展趋势和进展主要体现在液相色谱固定相填料和液相色谱检测器的研发两个方面。

一、液相色谱固定相填料的研发

键合硅胶固定相已成为近代液相色谱发展的主流，新型键合固定相分子设计、合

成、性能、应用及分离机制研究是当今 HPLC 的重要课题。反相 HPLC 硅胶键合相、传统硅胶键合相，特别是 C8 和 C18 硅胶键合相是使用最广泛的反相色谱固定相，通常只需优化流动相组成就可实现大多数有机化合物的分离分析。

随着超分子化学日益成熟并开始逐渐渗透到生命科学等学科和各个领域，超分子化学与色谱相互渗透的直接结果是出现了一系列极有理论价值和应用前景的大环化合物色谱固定相。由于硅胶的稳定性不理想，近年来许多研究者用氧化铝、二氧化锆和二氧化钛等金属氧化物做基质，在其表面上涂渍各种聚合物作为 HPLC 的填料。金属氧化物填料既有硅胶填料所具有的机械强度，又具有有机高聚物的化学稳定性，在强酸和强碱介质中稳定性好。因此用氧化物作固定相有其独特的优点。

生物分子和药物分子有大量对映异构体，这些异构体在生理和药理中有时起着完全不同的作用，所以对映异构体的分离成为色谱的重要任务，而 HPLC 是完成这一任务的重要手段。已经研究过的手性固定相有 700 多种，如含蛋白质的手性固定相，含糖类的手性固定相，含环糊精及其衍生物的手性固定相等。分子烙印技术是在模拟生物体内抗原与抗体相互作用时“锁匙”原理基础上发展起来的一种新型技术，利用该技术制得的分子烙印聚合物对于烙印分子具有“预定”的选择性，为针对具体手性分子的手性固定相设计提供了崭新有效的解决方法，从而在 HPLC 手性分离和制备方面受到了广泛的重视。分子烙印固定相是由功能性单体（如甲基丙烯酸和乙烯基吡啶）和分子印迹单体（如氨基酸）在一起聚合而成的聚合物。

总之，不论是何种类型的固定相对于手性异构体的拆分以及蛋白质和多肽大分子的分离仍在不断的探索完善之中。

二、液相色谱的检测器

新型的检测器，如紫外-可见光度检测器、拉曼光谱检测器、荧光检测器、化学荧光检测器、质谱检测器、电化学检测器、核磁共振检测器以及光电二极管阵列检测器等在不断地涌现。总之，检测器的研究其共同的方向均朝着灵敏度高、重新性好、响应快、线性范围宽、适应范围广、对流动相流量和温度波动不敏感、死体积小等特性的方面发展。

高压液相色谱技术的理论发展要求高效液相色谱仪的研发，而新型的高效液相色谱仪的出现又推动着液相色谱技术在理论上的发展。仪器的选型和购置要根据使用者的具体使用要求来选型和配置，配置仪器时不宜一味求全。

主要参考文献

刘道杰，邓爱霞．2004．新型高效液相色谱固定相研究进展．化学试剂，(1) ：10～14
欧阳平凯，胡永红．1999．生物分离原理及技术．北京：化学工业出版社．271～279
张剑荣，戚苓，方惠群．1999．仪器分析实验．北京：科学出版社．194～199
周先碗，胡晓倩．2003．生物化学仪器分析与实验技术．北京：化学工业出版社．209～221

第二十七章　生化分析仪

临床化学实验操作中的取样、吸试剂、混合、去干扰物、保温、检测、结果计算和报告的仪器操作称为临床化学的自动化分析，用于这一分析的仪器称为自动生化分析仪。该仪器常用于生化、免疫、微生物、血液、体液等的临床检验，减少了手工操作可能产生的误差，提高了准确性和精密度，并且提高了分析速度增进了经济效益。

第一节　基本概念与基本原理

一、基本概念

（一）终点法

样品与试剂充分混匀后，在机外指定恒温条件下进行反应。反应过程中，反应物吸光度 A 不断变化，一段时间后，A 值基本趋于稳定，此时反应到达终点。反应物终点吸光度 A 与样品中待测物含量有特定的关系。就目前所使用的试剂来说，可能成比例关系、线性关系或非线性关系。

（二）二点法

样品加试剂后，充分混匀，立即注入机内比色池，在指定温度下反应，在时间 $T1$、$T2$ 处分别读取反应物吸光度 $A1$、$A2$，计算 $(A2-A1)/(T2-T1)$。同样方法对标准物进行测试，然后作比较即可求得样品中待测成分的含量。

（三）速率法

样品加试剂后，充分混匀，立即注入机内比色池，在指定温度下反应，在时间 $T1$、$T2$、…、Tn 处分别读取反应物的吸光度，然后求取每分钟平均吸光度变化 $\Delta A/\mathrm{min}$，据此可求得待测成分的含量 C 样 $=\Delta A/\mathrm{min}\times k$（其中 k 为消光系数，为已知或用已知浓度的标准物标定）。

二、基本原理

自动生化分析仪的工作原理如图 27-1 所示。多束垂直单色光束照射比色杯内的有色液体，通过被测样品对光能量的吸收，由光电转换器（如光电管）将光信号转换成相应的电信号，信号经放大、整流，转换成数字信号，送入计算机，同时计算机控制驱动电力驱动滤光片轮和样品盘，计算机根据用户选择的工作方式对测量数据进行处理、运算、分析、保存，打印机同时打印出相应的结果，最后在测完每组样品之后，进行比色杯清洗。

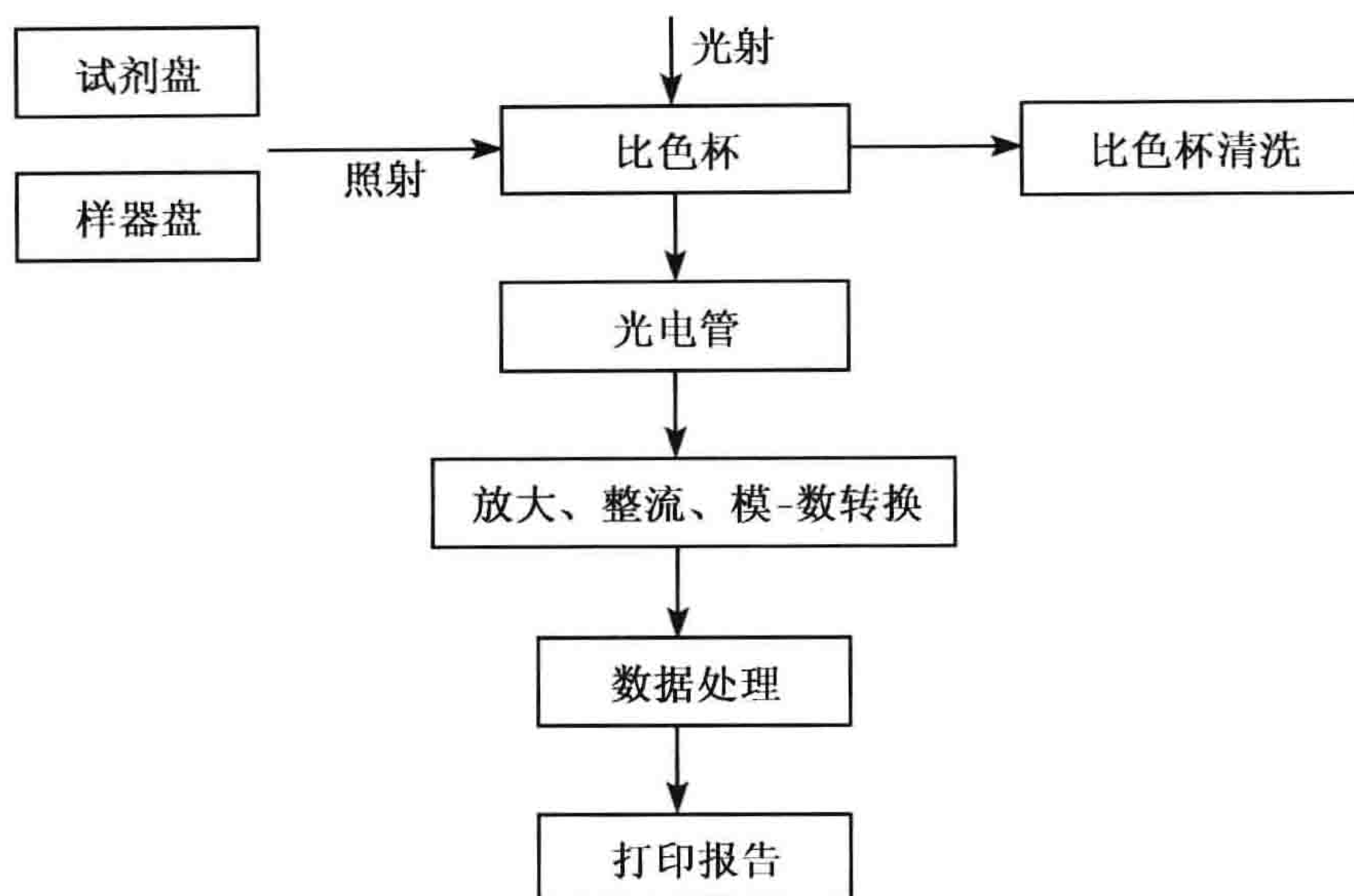


图 27-1　自动生化分析仪的原理图

自动生化分析仪可分为半自动和全自动两类。使用全自动生化分析仪可以使临床化学实验操作步骤全部由仪器独立完成，只需预先装入样品和试剂，确定仪器要检测的项目，仪器就会根据所检测项目的不同而选用不用的试剂，即分别自动抽取一定量样品和相应试剂，送入比色杯中混合，同时，置比色杯在一定温度下保持一段时间，即孵育。此后，仪器可抽取其他样品及相应试剂，送入另一比色杯，按此顺序直至取完最后一个样品，仪器会自动纪录下每种测定项目的孵育时间，并等待测定项目所需孵育时间过后，再按特定的工作原理，进行比色、读数，交计算机处理数据，最后打印出报告。全自动生化仪可由仪器内部电脑自动选择测定时所用波长，自动进行空白试验，自动混合比色杯里的反应液，选择合适时间进行自动测定，选择不同的计算公式，调节温度，同时可进行不同样品不同项目的测定，大大提高了检验效率。但如果使用半自动生化分析仪，必须由人工完成比色前的步骤。首先需要人工置样品与试剂于温槽中孵育一段时间，然后人工抽取一定量的样品和试剂到流动比色池中进行比色、读数、数据处理、打印报告。在检验时，只能逐项测定，效率较低。检测时由于存有样品和试剂的流动比色池难以清洗，还会受到一些人为因素的影响，检测的准确性和精密度不高。由此可见，半自动化生化仪与全自动生化仪的主要差异在于后者大大提高了检测的自动化程度、项目数、速度、准确性，节省了人力资源。

三、自动生化分析仪的分类

（一）连续流动式自动生化分析仪

世界上第一台自动生化分析仪是美国 Technicon 公司于 1957 年制造的，因所有的化学反应和测定均在管道的液流中完成，所以称为连续流动式自动生化分析仪。该类仪器由于管道系统结构复杂、不能克服交叉污染以及故障率高、操作繁琐等原因，在 20 世纪 80 年代初已经被淘汰。目前，只有一种特殊的尖端产品 Chem 1（Technicon 公

司）尚在生产，这一产品采用胶囊化学技术，即使用一种惰性氟甲烷液体与样品和试剂同时吸到分析管道中，在管道中形成封闭的壳。样品和试剂被包在其中，形成测试胶囊，并借助于吸进去的空气泡和蠕动泵的推动作用，使胶囊中的样品和试剂混合，混合反应在一系列直角环中发生，不断流动的胶囊，经保温和化学反应后，在一定的测定站进行光学检测，避免了交叉污染，分析速度可达到720次/h。

（二）分立式自动生化分析仪

该类仪器为开敞式生化分析仪，工作原理与手工操作相似，样品与试剂按特定比例加到分立的反应杯或管中进行混合、保温反应和检测。各个样品在分析过程中是彼此分立互不掺杂的，因此交叉污染率相对较低。该类仪器发展非常迅速，主要有3种形式：①反应杯转盘式分立式自动生化分析仪，它是目前最普及的形式，分析效率在200次/h以上。②袋式仪器，它是试剂在化学均匀透明的塑料夹中形成特殊的测试袋，分袋测试，测试袋被连续传送系统送进分析区，在混合器处经机械敲击，样品与试剂充分混合反应，在比色计处经一个特殊装置作用，测试袋形成光径1cm的比色杯，检测后废测试袋被排出。特点是污染少、灵活、准确，分析项目可达到60项。③干式自动生化分析仪，其特点是试剂固定在多层滤纸或胶膜上制成试剂条或试剂片，一定时间后用反射光度计测定，反射光浓度计算用Kubelta-Munk方程计算。干试剂仪器在测定项目、准确度、精密度、多功能和灵活性方面均可与湿试剂法媲美，且有不必配试剂、少污染、有的试剂条可用末梢血等特点。

（三）离心式自动生化分析仪

1968年美国Oakridge国立实验室的Norman Anderson创立了离心式自动生化分析仪，因在离心条件下完成分析全过程而得名，严格说来应属分立式。核心部分是一个离心机，反应盘自动或手工送至分析器，在一定转速下离心，离心力作用下样品与试剂混合、保温反应和监测。其特点是一批分析样品同时在快速旋转中被检测（称为平行分析），不同于连续流动式和其他分立式仪器种样品是按顺序测定的（顺序分析）。

四、影响实验结果的因素

1. 分辨率

分辨率是指生化分析仪所能反映的最小测量变化值。当量程变大时，通常分辨率下降。

2. 相对精度

相对精度是指测量值与真实值的差值与真实值的百分比。

3. 绝对精度

绝对精度决定着仪器的可重复性。可重复性越高，仪器越稳定，数据越可靠。

4. 交叉污染

用全自动生化仪检测标本时，有时会遇到一些项目，如磷、镁的结果偏高，复查结果就正常的现象。这种在项目组合时，因试剂成分对检验结果产生影响的现象称为交叉污染。目前除了一些高档的全自动生化仪为防止交叉污染，采用洗涤加脱气装置或超声洗涤装置外，一般随机组合式全自动生化仪可以通过增加洗涤的次数或改变吸取试剂的方式来消除这类污染。由厂家提供给客户使用的仪器参数、项目位置是经过反复论证的最佳状态，建议不要随意改动，否则容易造成测定结果不可靠。

第二节　半自动生化分析仪

一、基本结构组成

半自动生化分析仪的基本结构组成如图 27-2 所示。

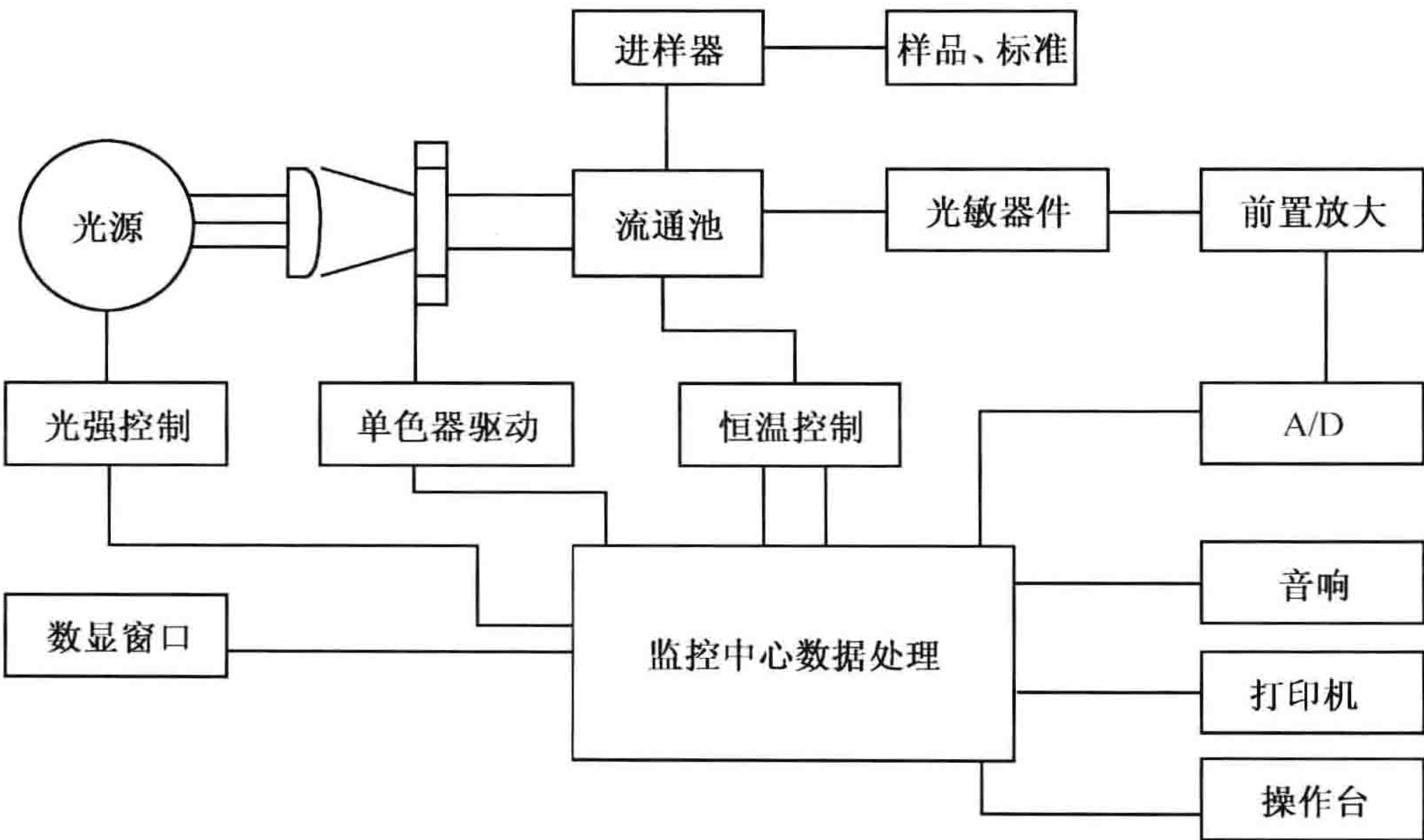


图 27-2　半自动生化分析仪结构图

二、不同型号仪器的性能特点

1. 德国 HUMALYZER 2000 半自动生化分析仪

该型号半自动生化分析仪采用微处理器控制、串并行输出口，人机对话极为方便；能够存储方法、结果和校正数据；自动控制温度，共有 12 个孵育位；波长范围可及紫外；能够自动计算结果，可存储 255 个实验结果，不受关机影响；设计了完备的开机自检、环境自检及故障提示。

2. 意大利 MENARINI 公司 SCOUT-II 半自动生化分析仪

该型号半自动生化分析仪采用后分光方式，对应 8 个干涉光片，每个波长都有独立

的信号处理电路，可同时进行测量，不同波长之间的切换无机械动作，测量快速准确，尤其利于双波长测量。钛合金比色杯容积小，易于流动冲洗，最大限度减轻交叉污染。触摸式键盘，选择所需的程序方便快捷。256×64点阵的图形液晶可同时显示字符及曲线，更有利于操作。软件设计合理，用户可自编各项生化实验程序；记忆系统可存128项由用户自编的实验程序并进行运算。备有自检程序及故障提示，测量误差小于1%，线性、重复性、稳定性好，交叉污染小。

三、故障排除

以意大利SCOUT半自动生化分析仪为例，介绍半自动生化分析仪的故障排除。

1）故障现象：启动“ASP”键吸液，吸完给定量液体，蠕动泵仍一直转动。

故障分析：该故障属于软件故障。

解决方法：按下面板“PARAM”（设置参数）键，调出主菜单，然后按下“ENTER”键转到增补参数菜单。上下移动光标选择参数，在试管内加入1ml蒸馏水，按“CALIB”键后，再按“ASP”键吸入液体，目视当液体被吸完时，立刻再按一次“ASP”键，此时试管内无水遗留，比色池内无气泡进入，校准完成。最后通过按下“ASP”键，观察是否正好吸完设置的吸液量，确定校准效果。

2）故障现象：通电，选定设置温度值（25℃、30℃、32℃或37℃），状态显示正常；几分钟后，其值忽高忽低，失去控制。

故障分析：软件故障。

解决方法：按下“AUTO CHECK”（自动检测）键，虽然显示正常状态，但过了几分钟，重新测试时，各种数据均异常。估计问题出在8126板。其电路构成主要是将各组采样值通过八选一模拟开关器（MC4051）输出（第三脚），经过比较器（TL084第三脚输入、第一脚输出）鉴别后送到A/D转换器（MC14433，第三脚为输入）输入数据总线。抓住开机瞬间状态正常和稍后状态异常的变化特点，进行电压测试，若没有变化，则说明MC14433输入之前的电路正常，更换MC14433排除故障。

四、日常维护和保养

1. 对新机进行系统的性能测试评价

购入新机进入常规使用前，对其进行系统的性能测试评价实验，所测各项指标必须都达到生化分析仪国家标准，其中线性、精密度、稳定性、互染率、吸样重复性及杂光等均可靠。

2. 对于关键易损部位进行特别维护

需要维护的主要部件有：比色杯、触摸式键盘、进样装置、微电脑等。若为连续流动比色池，容易产生交叉污染及比色杯的污染，因此对比色杯的维护尤为重要。每次使用完后，用蒸馏水洗1min以上，每周用生化分析仪清洁剂洗一次，5min以上，必要时用1mol/L HCl和甲醇1∶1混合，冲洗1～5min，洗去沉积在比色杯表面的色素和蛋

白质，保持比色杯底洁净；触摸式键盘需用硬塑料膜覆盖，防止直接磨损；进样管为毛细管，与金属管口接触部位容易受损，可在外套一段软塑料管，保护进样管，每次使用应用手扶住进样管，防止化学液体污染机身；对硅胶泵管每天使用完后使其放松，保持良好的韧性，延长使用寿命；使用机器首先需要保证稳压电源，按规定程序开机、关机，保护微电脑、恒温控制系统不受人为损害。

第三节　全自动生化分析仪

一、结构组成（以 LIASYS 全自动任选式生化分析仪为例）

1. 取样臂

取样臂为三维连动机械臂，探针备有电容量感应液面检测器及内置加温器，使在冷藏室吸取的试剂在极短的时间内达到 37℃；每次吸取样品、试剂后均会执行探针清洗程序，以免项目之间的交叉感染。

2. 稀释器

采用最先进陶瓷内芯注射稀释器，取样精确，无需保养。

3. 试剂架

四组独立试剂架提供 33 个 40ml 冷藏试剂位置，11 个标准或质控液位置，2 个稀释液位置。

4. 样品架

四组独立样品架提供 64 个位置及一组急诊样品架提供 14 个急诊位，使操作者可连续交替载入样品而无需终止或暂停操作，可进一步提高仪器的效率。仪器除可使用一般样品杯外也可使用载入原试管样架及选配条码标签。

5. 清洗台

五组独立功能清洗探头分别提供清洗液冲洗、蒸馏水冲洗、洁净度检查、吸干、抽干等功能，在冲洗过程中仪器会自动检查杯的质量，符合标准的比色杯才会继续被使用。

6. 反应盘

60 个独立光学比色杯，采用特殊材料制成，蛋白质不易黏附于比色杯壁上，冲洗更容易，洁净度更高。全自动冲洗系统使比色杯能不断循环使用。

7. 电脑系统

IBM 兼容电脑，WINDOWS98 操作系统。

二、不同型号仪器的性能特点

（一）奥林巴斯大型全自动生化分析仪

该型号全自动生化分析仪的光路系统采用 OLYMPUS 全球领先的集束式光路及全息光栅技术，使波长范围更宽，稳定性更高。结合高速全数字化，机内通过数字光纤传输检测信号，大大减少各种干扰，提高了检测精度和速度，实现了超微量检测，测试容量低至 150μl。恒温系统采用独创的恒温液循环加温方式，集干式空气浴和水浴的优点，恒温液为热容量高、蓄热能量强、无腐蚀的液体，使恒温均匀稳定；加上比色杯为可永久使用的硬质石英玻璃，无需定期更换与保养。带冷藏装置的 22 位急诊转盘，可随时插入急诊样品，并可设置放入质控物和定标物，无需取出，可随时进行周期性质控及定标，适合更多高要求的测试。设计了最新的智能化探针安全系统，一旦探针遇到阻碍，探针立即停止运动并报警。样品探针还设有探针阻塞报警系统，当探针被样品中的凝块、血脂及纤维蛋白等物质阻塞时，机器会自动报警、冲洗探针，跳过当前样品，进行下个样品测量。操作系统为最新 WINDOWS NT 界面，更方便实现网络化工作，功能强大。全开放式试剂系统，并可随意对样品进行预稀释。

（二）EOS890 PLUS 全自动化分析仪

该型号全自动生化分析仪为任选批量式全自动生化仪，适用于临床化学和免疫比浊测试。内置急诊模式；实时显示反应曲线；3 级质控模式；自动血清稀释；任意选择稀释比率，自动处理校准曲线。测量方法有终点法、双波长法、固定时间法、动力学法、多标准法、酶标比色法、免疫比浊法。可存储多达 200 种测试程序。

三、故障排除（以日立 7170A 为例）

1．“Cell Blank”报警的处理

7170A 能自动监测反应杯空白值。当杯空白值相差超过±800 时，仪器发出报警信号，并显示此反应杯编号，以便操作者做出处理（7020、7060、7150 等型号具有同样的功能）。遇到此类情况，操作者可将报警显示反应杯取下，从以下几方面进行检视：

1）看其表面是否划伤，轻微划伤不易察觉，需从不同侧面仔细观察。如有划伤，大多情况下是由于清洗机构上的白色擦拭片位置不正所致。遇此情况，纠正其位置后同时更换反应杯即可。如擦拭片磨损严重，需及时更换，否则反应杯清洗不净，造成交叉污染，影响结果准确性。

2）如没有划伤，而是脏污，则可用 3%盐酸乙醇逐个擦洗，完毕后用蒸馏水冲净，还原。还原前最好清扫反应槽。执行仪器清洗功能后，测杯空白，一般都可通过。杯空白报警，多数是由于杯子脏污所致，用此法清洗，效果良好，一套反应杯可使用半年以上，节约了成本（仪器说明书推荐为每月更换）。

3）做了上述维护后仪器仍报警，这时则要检查杯子中用于杯空白测定的蒸馏水位是否足够，正常情况水位应在 1/3 左右。如低于此水位，则进水电磁阀被堵，此时需拆

下仪器后面板，用注射器吸 HITERGENT 溶液（仪器配套清洗剂），接到电磁阀入口上，让仪器执行杯空白测试功能，在电磁阀开启的瞬间用力推注射器，冲洗电磁阀数次，然后再用蒸馏水冲洗几次，还原即可。

4）光源灯老化，此种情况执行吸光度检查功能，即可做出判断，若 7170A 型的实测值≥19 000，7020、7060、7150 型的实测值≥16 000 即需更换灯泡。

2. 真空罐积水报警

对于此种情况，仪器说明书上介绍的方法是放掉真空罐中积水后还原即可。但往往照此方法做后问题不能根本解决，不久仪器又出现报警。若为控制废液排出的电磁阀被堵使废液不能排出而返流入真空罐所致，需拆下电磁阀进行清洗，注意的是要记住拆装顺序，以便还原，清洗完毕后还原即可。为减少以后的拆装麻烦，平时除多注意执行仪器清洗功能外，日常做保养时可拆下清洗机构上标号为 1、2 号的乳胶管，放入盛有 10％次氯酸溶液烧杯中，执行仪器机械检查功能，即可达到清洗此电磁阀的目的。

3. 蒸馏水箱水位下降报警

此报警多为仪器总供水口被堵所致，清洗还原即可。这也提醒操作者平时保养仪器时不要忘记清洗外部供水箱和供水管。当然首要条件是采用优质的外部供水设备。

4. 真空泵负压低

按仪器说明书提示，此故障多为真空罐的橡胶塞处漏气。但也存在特殊情况，并非橡胶塞漏气，而是与真空罐相连通的控制外部空气吸入的电磁阀关闭不严所致。遇此情况，拆下此电磁阀清洗一下，再重装即可。

5. 反应杯清洗流路阻塞故障的处理

更换新反应杯，几天之后即发生杯空白报警，排除其他因素，检查发现反应杯清洗液仅加到 1/3 杯的量，有时仅加出几滴，而清洗液容器中的量足够满。为节约成本，大多仪器使用者均采用自配反应杯清洗液，而易致清洗液流路阻塞。用容器装上约 50ml 5％的次氯酸钠溶液替换清洗液容器，执行机械检查，直到清洗液能加满反应杯为止。若仍未清除阻塞，则可用 0.5mol/L 的 HCl 替换 5％的次氯酸钠溶液，执行以上操作，即可排除此故障。

四、日常维护和保养

（一）日常检查

1）供水水质是否保证。

2）1D1 和 2D1 处 HITERGENT 清洗剂，1D2、2D2′处的清洗液、W1 位清洗液、比色杯清洗液是否足够。

3）样品针、试剂针、搅拌棒、清洗机构吸嘴等是否脏污、完好。

4）样品、试剂分配注射器是否漏液、完好。

以上内容如有疑问，应立即处理更正补充。

（二）每日保养内容

1）用无水乙醇擦净样品针、试剂针、搅拌棒、清洗机构吸嘴，并用无水乙醇清洗取样针、搅拌棒冲洗喷嘴及冲洗水排出管路。

2）擦净样品舱（S1、S2）、试剂舱（R1、R2），倒净废液桶。

3）每日执行维护画面中的“AirPurge”、“Photometer Check”。

（三）每周保养内容

每周执行一次“Wash”程序，之后做光度检查，再执行“Cell Blank”（1号杯光度小于19 000，其余杯间差在±800以内）。

（四）每月保养内容

1）清洗反应杯，将反应杯拆下，用2%HITERGENT溶液浸泡过夜，清洗之后用去离子水浸泡洗净，装好反应杯后执行“Wash”，之后再执行“Cell Blank”。

2）拆下反应杯的同时，用2%HITERGENT溶液清洗反应槽及透光窗。

3）用水清洗恒温循环水过滤网、进水口过滤网、散热器滤网。

4）用5%次氯酸钠溶液洗净清洗机构废液流路，再用去离子水清洗（执行机械检查程序进行清洗）。

（五）其他保养内容

每1个月擦净各取样机构转轴上的旧油，并用纯度高的润滑脂薄薄涂匀，每年更换一次循环冷却水，其他部件的维护保养适时进行。

第四节 生化分析仪的基本操作及要点

一、生化分析仪的使用

目前国内市场上的生化分析仪多为进口产品，在使用仪器前应弄清使用仪器的每一环节，避免由于错误操作而造成仪器损坏。特别值得注意的是使用前一定要安装稳压装置，以防电压波动而造成仪器内零部件损坏。

每个项目在测定之前，必须为其设置各种参数。不同测定模式需设定不同参数。一般半自动生化分析仪的参数包括温度、波长、吸光度范围、正常值范围、标准物浓度、试剂用量、样品用量、延迟时间、测量时间、因子等。参数设置的正确与否对结果影响十分大。如酶法延迟时间、测量时间的设置不同，所得到的结果相差很大。操作过程中应严格按说明书要求进行操作，应选择合适的吸液量，即可节省试剂又不影响测定结果。

二、操作要点

(一) 仪器的工作环境

好的仪器必须放置在与其性能相适应的工作环境中，否则就不能发挥其作用，在这一点上需要注意了以下两个方面。

1. 选好安放地点

理论上自动生化分析仪应安放在无尘室中，但这不可能也不现实。一般实验室，仪器应放在平稳的地面（或台面）上，不应受到震动颠簸，并注意防潮、防尘、防腐蚀，周围环境应避免高强的噪音，无大磁场、电场干扰，房间内应有除湿机和合适功率的冷暖两用空调机。

2. 电源

提供与仪器相匹配的稳定电源，最好是在线式不间断电源，能延迟 5h，功率可供自动生化仪和空调使用。仪器必须按精密仪器的地线要求接地。

(二) 仪器的技术性能评价

仪器安装调试完毕正式启用前，应该对仪器的技术性能做全面评价，而不能盲目相信厂家提供的性能参数，评价的方式、条件和结果必须做详细记录，以备今后对比分析。为了随时了解仪器的工作状态，应定期（特别是更换了仪器重要部件后）对仪器进行性能评价，评价指标主要包括精密度、准确度、灵敏度、互染率等。必须强调的是，不能以该厂家提供的质控物作标准来判断该仪器的准确度。

(三) 试剂的选择

现在，供选择的试剂种类和厂家很多，除考虑价格包装等外在因素外，必须通过对试剂进行评价，才能做出选择，所用试剂一旦选定，若没有特殊的原因，最好不要更换，评价分为上机应用前的检查和上机评价两部分，两部分均合格的试剂才能应用。

1. 上机使用前的检查

检查内容包括：该试验有无国家批准的生产、销售许可证；试剂配方是否使用中华医学会检验分会推荐的配方。自动配方是否合理，有无权威机构的认可；配方是否可排除操作人员肉眼无法观察而对试验结果影响极大的干扰因素。例如，血糖（氧化酶法）、胆固醇、甘油三酯等试剂配方中是否含抗坏血酸氧化酶，该酶能排除维生素的干扰；是否是真正的双试剂。总之试剂使用前，必须仔细阅读说明书，注意试剂的组成，以免影响参数的设置。

2. 上机评价

上机评价的指标包括精密度、准确度、方法的特异性（抗干扰能力）、分析的灵敏

度、参考范围、患者结果的可报告范围、试剂的稳定性等，除此以外还需注意两个方面：①检查试剂中重要成分的含量，确定是否与配方中提供的浓度一致；②慎用厂家提供的仪器参数。

（四）做好室内质量控制

仪器再精密也有出现偏差的时候，因此建立完善的室内质控制度是确保检验结果可靠的基础。有以下几点需要注意：

1）建立本实验室的室内质控可接受范围。无论是进口的还是国产的，定值的还是非定值的质控血清都必须在常规条件下建立本实验室的统计学参数包括均值、标准差和变异系数等，并以此均值作为靶值确定本实验室的室内质控可接受范围，若采用的是定值质控血清其均值应与提供的靶值接近。

2）确定合适的质控标本次数和时间，并形成制度持之以恒。每天在开始常规标本检测前，应先作一次各项目的室内质控，结果必须在可接受范围内，失控必须查找原因，每一批次的常规检测间隔 30 个标本应插放一轮质控标本，结果必须在可控制范围内才能将报告发出。

3）必须同时采用高、中、低三个浓度值的质控血清。

4）室内质控必须有完整的记录（包括原始记录），失控时应有纠正措施并做详细记录。

（五）其他

1）严守操作程序，既要有详细的操作手册也要有简单明了的操作流程图，并注明仪器正常运转状态下的标志。

2）建立明确的仪器维护方案（包括年、季、月、周、天维护），以保证仪器和检查系统维持良好的运转状态。仪器的维护、维修必须有详细记录，以便今后查阅。加样针、试剂针是否清洁、有无堵塞直接影响加样的准确性，因此必须重点维护。自动清洗后观察针外是否挂有水珠是检查二者清洁与否的一个简单易行的好办法。

3）并非所有项目每天都必须做校准检查，应根据仪器的稳定性和该项目试剂的稳定性确定校准频度，另外校（标）准液包括数目、类型、浓度的选择要恰当，建议采用高、中、低三个浓度值的标准品，这样可观察到该项目的检测是否呈线性，是否通过零点。每次校准后应做校准后验证。

4）蒸馏水和清洗液的质量与检测结果密切相关不可忽视。我们认为蒸馏水制备后应在一周内使用且其阻抗值应以 0.5mΩ 以上。合格的清洗液应不影响反应曲线和检测结果，在仪器自动清洗比色杯后无水珠悬挂。

5）供检测的血清（浆）标本应避免溶血，绝不允许有纤维蛋白丝飘浮，如为原始标本管上层血清（浆）高度应在 10mm 以上。仪器的参数应做备份处理或记录以便仪器故障参数消失后能尽快恢复。

6）所用试剂特别是配方中含有 NADH 的试剂必须在有效期内，否则由于 NADH 降解将造成检验结果低值升高而高值偏低。

第五节　生化分析仪在生物学中的应用

半自动生化分析仪或中型自动生化分析仪一般只能测定临床常规生化项目，大型高性能自动生化分析仪则往往是同时可测 20 个以上项目的多通道分析仪，且具有任选功能。大型分析仪由于设计精巧，具有可见光/紫外光、反射分光光度计、散射光/透射光比浊、荧光/荧光偏振、离子选择电极等测定功能，使仪器除了常规生化项目测定外，还可以进行特殊蛋白质、免疫球蛋白、激素以及血液中药物浓度测定等。

一、生 化 检 验

目前自动生化分析仪项目任选水平最高可达 60 项，一般 20～40 项。除常规生化项目外，诸多仪器均配有离子选择电极，因而具有检测电解质和 pH 等功能。

二、免 疫 检 验

由于诸多大型自动生化分析仪配有紫外光、散射光/透射光比浊功能，目前用免疫消浊法测定免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM、补体 C3 及 C4、载脂蛋白 APOA1 及 APOB、纤维蛋白原（Fb)、转铁蛋白（Tf)、前白蛋白（PA)、铜蓝蛋白（CP)、C 反应性蛋白（CRP）等已经普及，且试剂供给已经国产化。该法融合了免疫血清的特异性及生化比浊自动化的快速敏感性于一体，比传统的免疫扩散法快速而结果客观，克服了主观的监测误差。其测定原理是抗原（Ag）与其相应抗体（Ab）在液相中相遇，立即形成 Ag-Ab 复合物，并形成一定浊度。该浊度的高低在 Ab 存在时与 Ag 含量成正比，同时由于反应液中有消浊剂，可使非 Ag-Ab 复合物（如脂质、大分子蛋白多聚物）消散，因而特异性高，能正确反应 Ag 含量。同时人们也采用更新测定项目，如在分析仪上用颗粒增强浊度抑制分析法（particle-enhanced turbid metric inhibition assay）检测尿中白蛋白以监测糖尿病，灵敏度高。

三、药 物 监 测

一些大型高性能自动生化分析仪具有荧光/荧光偏振功能，所以在快速监测药物方面具有显著优点。荧光免疫分析法（fluorescence immune assay，FIA）是用荧光物质作为标记物的分析方法，在灵敏度和应用范围均可与放射免疫（RIA）和酶免疫法（EIA）相比。由于荧光物质没有同位素的污染问题，又可克服酶的不稳定性，在药物监测中大有超过和取代 RIA 和 EIA 的趋势。其中最常用的方法是荧光偏振免疫分析（fluorescence polarization immune assay，FPIA)，它是根据标记药物与抗体结合后荧光偏振的改变而进行测定。荧光标记药物与抗体结合后形成一个大分子复合物而旋转慢，易接收偏振光的激发而发射荧光偏振，没与抗体结合的荧光标记药物分子小而旋转快，荧光偏振消失，偏振光强弱与血中药物浓度成反比。随着自动生化分析仪功能的不断完善，该仪器必将在医学检验中发挥越来越大的作用。

第六节　生化分析仪的发展

从近年来的发展看，流动式仪器受到其复杂的结构、繁琐的操作和交叉污染的限制，除特殊的Chem1（Technicon）型仪器外，其他已遭淘汰。而Chem1的技术过于尖端，发展和普及也受到影响。分立式中的离心式仪器非常适用于批量分析，但它的任选功能和速度的提高受到结构及工作原理的限制，目前无太大进展。其他分立式仪器在结构设计上和功能开发及新技术的应用上有较大潜力，灵活性大，近年来发展极其迅速。

目前高性能仪器一般有以下功能：用条形码标记样品和试剂并由读码器识别，大大提高了工作准确率，同时操作人员的安全性提高；比色皿的自动清洗功能及惰性液应用能有效地防止交叉污染；任选式功能（即单通道任选多个化验项目功能）最高者可达60项；各种自检、自动重检功能、警告功能；急诊样品插入功能；管理功能包括实验程序管理、数据管理、质控管理。

20世纪90年代以后，自动生化分析仪的基本设计思想主要是通过硬件和软件两方面不断改进和充实以扩大仪器的使用范围和完善各种功能。硬件的发展主要表现在各种尖端材料和技术在仪器结构方面的应用，如比色杯、光学系统（包括光源、光栅、滤光片）和电子、机械元件的选择以及仪器各部分的设计、电脑功能等；软件的发展主要是各种自动控制的编制、生物化学方法学和试剂的开发、数学计算模式的应用等，两者的发展都将使仪器在应用灵活性、多功能性、准确性、精密度、工作效率和成本效益方面收到成效。

自动分析仪的发展趋势为采用的尖端技术、可测的反应类型和相应的项目增加；测定的准确性、精密性、速度、项目增加；软件功能增加；灵活性和自动化程度增加。同时，样品量减少；试剂消耗减少；硬件部分减少；人工参与减少。

主要参考文献

鲍峰，胡菊芳，朱世根．2000．自动生化分析仪的发展．东华大学学报（自然科学版），(4)：103～106
胡洪亮，王鸿利．1998．自动生化分析仪的发展趋势及在医学检验中的应用．现代医学仪器与应用，(1)：4～7
黄煌镜，夏红林．2003．意大利SCOUT半自动生化分析仪的故障排除．医疗装备，(2)：54
梁先念，陈孝红，高颖斐．2001．日立7170A型全自动生化分析仪的维护保养及常见故障处理．医疗卫生装备，(6)：69～70
廖璞，程海平，王淑琴等．2001．全自动生化分析仪的使用体会．江西医学检验，(1)：53～54
吴太虎，曹占良．1994．半自动生化分析仪的原理与关键技术．医疗卫生装备，(4)：16～19
幸贵邦，黄维嘉．2001．日立7170A全自动生化分析仪故障排除与应用技巧．陕西医学检验，(1)：46
杨洪芬．1998．BT-224半自动生化分析仪的维护．医疗装备，(3)：31

第二十八章　离　心　机

离心机是集机械、电气、力学、制冷、真空、生物化学等多学科于一体的科学仪器。自1926年问世以来，被广泛用于工业、农业、国防、生物医学工程、动植物研究及医疗卫生等领域。随着相关学科的发展，离心机的构造越来越复杂，科技含量、自动化程度不断提高，目前已经设计出最高转速达120 000r/min的超速离心机。高性能的超速离心机体现了科学技术的综合水平，只有少数几个国家能够生产出这类机型（图28-1）。在分子生物学实验过程中，离心技术是最常用的技术之一，主要利用离心机转头转动时产生的强大离心力场对物质进行沉淀、分离、纯化、浓缩等处理。

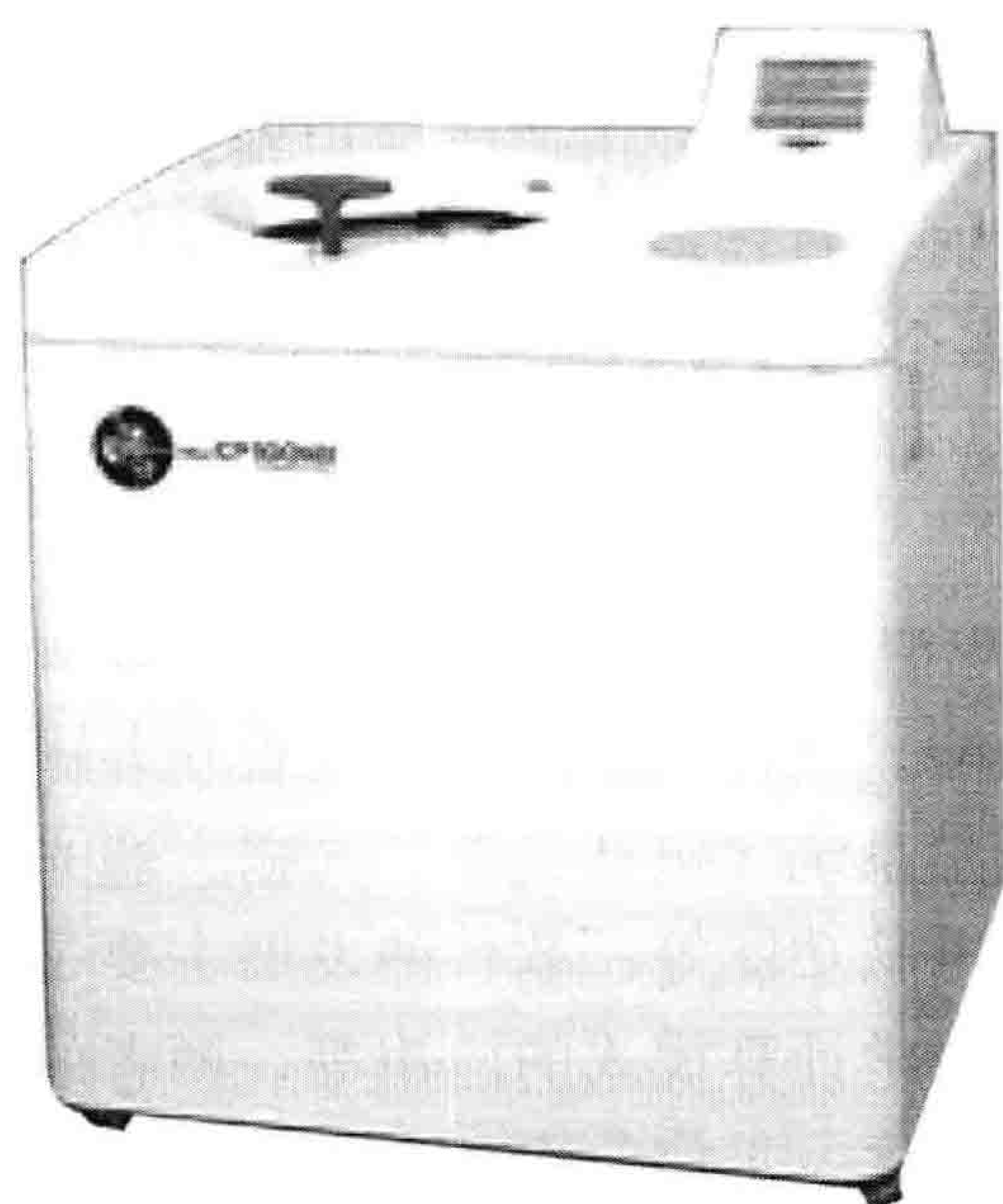


图28-1　HITACHI制备型超速离心机CP70MX

第一节　基本原理与基本概念

一、基本原理

（一）离心力（centrifugal force，Fc）

离心就是在高速离心场的作用下将不同大小或不同密度的颗粒相互分离的方法。离心场中的颗粒都受到一个向外的离心力：

$$Fc = m\omega^2 r \tag{28.1}$$

式中：ω为角速度，ω=2πr/min/60，r/min为转头每分钟的转数，r为离心管与中轴的距离（cm），即离心半径。

（二）相对离心力（relative centrifugal force，RCF）

由于各种离心机转子的半径或者离心管至旋转轴中心的距离不同，颗粒所受的离心力也不同，因此超速离心中常用相对离心力表示离心力，只要RCF值不变，一个样品可以在不同的离心机上获得相同的结果。RCF就是实际离心场转化为重力加速度的倍数。

$$\mathrm{RCF} = G/g = \omega^2 r/g = 1.118\times10^{-5}\,Nr \tag{28.2}$$

式中：N为转速（r/min），r为离心半径。从公式中可以看出：为取得大的RCF，可采取两种途径：增加转速（r/min）或增大离心半径（r）。因为离心力与转速的平方成正比，因此提高转速效果明显，但是转头应有特定的大小，以保证容纳一定体积的待分离溶液。

不管采用哪种方法，RCF 的增加是有一定限度的，因为制作转头的材料具有一定的最大抗拉强度，如果超过这个值，材料就会破坏。因此，一般来说，对于具有一定最大抗拉强度的材料所制成的转头，体积（半径）越大，其相应允许的最大转速越低。在使用中为了安全起见，对于每个转头（半径一定）都给出最大的允许转速，厂家在设计制造转头时所采用的标准是在 2 倍于最大离心场下运转 10min，转头伸长不超过 0.1%。用户在使用时一定要注意，不得使转头在超过最大允许速度下运转。

（三）沉降系数（sedimentation coefficient，*S*）

颗粒在单位离心力作用下的沉降速度被称为颗粒的沉降系数。把 10^{-13} s 作为一个单位，称为斯维得贝格单位（Svedberg unit），或称沉降系数单位，用 S 表示：

$$S = v/\omega^2 r = (dx/dt)/\omega^2 r \tag{28.3}$$

式中：v 为颗粒在离心场中的沉降速度：

$$v = (\rho_p - \rho_m) d^2 \omega^2 r/18\eta \tag{28.4}$$

式中：d 为球形颗粒直径，ρ_p 和 ρ_m 分别为颗粒和溶剂的密度，η 为溶剂的黏度。

（四）沉降时间（sedimentation time，*T*s）

在实际工作中，常常需要利用离心机上把某一种溶质从溶液中全部沉降分离出来，这就必须首先知道用多大转速与多长时间可达到目的。如果转速已知，则可计算分离某粒子所需的时间，即沉降时间。

$$s = (dr/dt)/\omega^2 r = \int r_m dr/\omega^2 rt = r_b(\ln r_b - \ln r_m)/\omega^2 rt$$

$$t = (\ln r_b - \ln r_m)/\omega^2 s \tag{28.5}$$

式中：r_b 为旋转轴到管底的距离，r_m 为旋转轴到离心管液面的距离。通过转速可以计算出从离心管表面沉降到离心管底所需要的时间（t）：

$$t = (10^{13}/3600)(\ln r_b - \ln r_m)/\omega^2 s \tag{28.6}$$

（五）*K* 系数（*K* factor）

K 为实际转头的参数，是用来描述在一个转子中将粒子沉降下来的效率，也就是溶液恢复到澄清程度的一个指数，所以也叫"cleaning factor"。原则上，*K* 系数越小，越容易也愈快将粒子沉降。

$$K = [(\ln r_b - \ln r_m)/\omega^2] \times 10^{13}/3600 \tag{28.7}$$

K 系数与离心转速及粒子沉降的路径有关。*K* 系数是一个变数，当转速或者离心管的容量不同，即粒子沉降的路径改变时，*K* 系数就改变了。通常，离心机的转子说明书中提供的 *K* 系数，都是根据最大路径及在最大转速下所计算出来的数值。

二、影响分离效果的因素

从仪器本身来考虑，下述几个方面直接影响到分离效果：

（一）离心速度

离心速度大小决定了颗粒的沉降速度，对不同大小的颗粒可使用不同的离心速度，因此对于离心机来说要具有一定的速度范围。另一方面要求有稳定的速度，即速度的控制精度要好。

（二）温度

不同温度下，离心介质的黏度不同，有些介质黏度变化很大，因此要求离心机对温度控制达到一定精度。另一方面大多数生物材料要求低温，以保持生物活性。离心机转头在高速运转时影响转头温度的因素是多方面的，各厂家采用了不同措施来解决这一问题，如控制真空包括除湿气、防止电机热的影响和改进测温及控温系统等。

（三）时间

现在准确记时并不困难，但对于离心机而言，长时间离心（有时达 50h 以上）对离心机的各部件的稳定性则有严格的要求。另外某些离心要求对加、减速要有所控制，并考虑加、减速期间的离心效果，新型离心机上都采用加、减速可调、慢加速、$\omega^2 t$积分器等。

（四）离心距离

对于转头来说，控制一定的离心半径有两个目的，一是具有一定的离心体积，二是根据转头半径决定颗粒下沉的距离。较大的转头要求较大的电机功率和较大的离心腔直径。

（五）其他

为取得好的分离效果，有些问题是设计离心机，选择离心机时应考虑的，如振动、转头中的温度梯度及热对流等。这些因素会对梯度离心、分析离心的测定产生不利的影响。

三、离心方法分类

根据离心原理，按照实际工作的需要，目前已设计出许多离心方法，综合起来大致可分为三类。

1. 平衡离心法

根据粒子大小、形状不同进行分离，包括差速离心法（differential velocity centrifugation）和速率区带离心法（rate zonal centrifugation）。

2. 等密度离心法（isopycnic centrifugation）

又称等比重离心法，根据粒子密度差进行分离。等密度离心法和速率区带离心法合称为密度梯度离心法。

3. 经典式沉降平衡离心法

用于对生物大分子分子质量的测定、纯度估计、构象变化等。

第二节　离心机概述

一、分　类

由于离心机的用途广泛，机型种类繁多，各生产厂家的离心机都有自己的特色。因此，对离心机没有一个严格的分类标准或规定，但目前通常采用的分类方法有以下几种。

（一）按离心速度分类

1. 低速离心机

最大转速一般在 6000r/min 左右，主要用于血液或细胞制备、蛋白质和酶沉淀物的分离，由于不能产生足够大的离心力场，所以不能分离超小粒子（如病毒和 DNA 分子）和大分子，也不能行密度梯度离心。

2. 高速离心机

最大转速一般在 25 000r/min 左右，能分离病毒、细菌、细胞核、细胞膜、线粒体等，也可用于 DNA 的制备。

3. 超速离心机

最大转速一般在 100 000r/min，配合光学仪器，可用于分子质量测定、蛋白质结构及其聚集状态分析、化合物纯度检定等。

（二）按用途分类

1. 小型离心机

一般指体积较小的台式离心机，转速可以从每分钟数千转到每分钟数万转，离心管的容量由数百微升到数十毫升。小型离心机多用于小量快速离心。为适应目前分子生物学研究的需要，有些厂商又推出了带有制冷装置的小型离心机。

2. 制备型大容量低速离心机

一般为离心机体积较多、机型体积较大的落地式离心机。最大转速为 6000r/min 左右，最大容量可达 500ml×6。大多数离心机均设有制冷系统。

3. 高速冷冻离心机

与大容量低速离心机相似，但离心速度比后者高，并设有制冷系统。高速冷冻离心

机的最大速度在18 000～21 000r/min，离心容量可以选择转头调整转速，主要适用于细胞及亚细胞结构的分离。

4. 超速离心机

具有很大的离心力，最大速度可以达到100 000r/min，可以进行小量制备，最大容量可达500ml。适用于蛋白质、核酸和多糖等生物大分子的制备。

5. 分析型离心机

主要用于生物大分子定性、定量、分析的超速离心机。最大转速在80 000r/min左右。

6. 连续流离心机

主要用于处理类似于发酵液等特大体积、浓度较低的样液。最大离心速度与高速冷冻离心机相近。

（三）按驱动系统分类

1. 空气驱动离心机

这类离心机以压缩空气作为推动力，利用压缩空气推动空气涡轮带动转头转动，在转动过程中转头被压缩空气托起悬浮在离心室中高速旋转，产生强大的离心力场。这种设计无机械摩擦，最大转速可达60 000r/min。这类离心机比油轮驱动离心机结构简单，造价低，但是在低速运转时不太平稳，不宜用于沉降平衡实验。

2. 油轮驱动离心机

这一类离心机是在离心时将转头横放在转动轴上，其驱动装置利用高压油泵喷射枪作为驱动力，将油喷射在转动轴端叶片上，使其高速运转，产生强大的离心力场，一般最大转速可达75 000r/min。

3. 电机驱动离心机

目前大多数超速离心机使用的驱动系统是电机驱动系统。早期使用的电机主要是齿轮驱动电机或碳刷电机驱动，最大转速可达80 000r/min以上。后来使用变频电机驱动，高速和低速离心机均采用该驱动方式。变频电机驱动已成为离心机驱动结构的主流，具有噪声小、运行平稳、转速精确、寿命长等优点，最大转速可达100 000r/min。

4. 磁悬浮驱动离心机

该类离心机也是利用压缩空气为推动力，将压缩空气喷射到空气涡轮上，推动转头旋转加速，待速度达到预定转速时，然后用电磁力量将转头托起悬浮于离心室中。由于离心室内处于真空状态，空气摩擦力极小，故转头能长期自由旋转，最大转速可达

60 000r/min。转速可以精确控制，适用于低速长时间的沉降平衡离心。

（四）按使用功能分类

可分为普通离心机、制备离心机、生产专用离心机、分析离心机和连续流离心机等。生产专用离心机，如 BECKMAN 公司的疫苗离心机。

分析离心机具有光学检测器，如 BECKMAN 公司的 Optima XL-A/XL-1 型离心机。备有紫外光和干涉光两种检测器，适合于对糖类和高浓度样品进行分析，利用衍射光栅进行分光，光电倍增管进行信息放大，结构上相当于一个分光光度计。该种离心机可用于绝对/相对分子质量测定，样品浓度、纯度测定，分子的聚合、解离分析，热动力学和流体力学参数确定，核酸、蛋白质及病毒测定与分析，分子间相互作用等。

二、结　　构

虽然离心机有各种各样的类型，结构也越来越复杂，但离心机的基本结构大同小异。以超速离心机为例，离心机的基本构造大致分为以下系统。

（一）驱动系统

驱动系统包含电机，它是离心机的心脏，是提供离心机动力的重要组成部分，有利于精确控制加减速度。作为超速离心机的驱动系统应当满足运行时摩擦小、提速快、运行平稳等要求。驱动系统不同类型均有不同寿命限制，在购买时应注意使用年限或累积的总转数。驱动系统主要分为油轮驱动系统、空气涡旋驱动系统、磁悬浮驱动系统和电机驱动系统。

（二）制冷系统

由于高速离心机或超速离心机在离心时速度高达每分钟数万转，转头与空气摩擦产生大量的热，这不但影响试样在离心时的变化，还会导致转头受热膨胀。因此，在高速离心机和超速离心机中设计了制冷系统，冷却离心腔，保持在较低的温度下离心，冷却系统尤其对生物样品非常重要。制冷系统主要由温度传感器和制冷器组成，以前多采用 CFC 制冷，现在主要采用臭氧制冷和半导体固态制冷。

（三）真空系统

由于超速离心机的离心速度非常高，通过制冷系统还不足以抵消转头与空气摩擦产生大量的热，因此设计了真空系统，以减少离心室中的空气与转头产生的摩擦热。根据超速离心机设计速度不同真空系统设计也有差别，一般在 60 000r/min 以下的超速离心机，只使用简单的机械油泵来抽真空，这种泵的真空度可达 13.3Pa；在 60 000r/min 以上的超速离心机，要使用机械油泵加油扩散二级真空系统。这种泵的真空度可达 0.133Pa。真空系统给操作、维修保养带来许多不便，因此在高速离心机（除极少型号）和低速离心机中均不使用真空系统。

（四）控制系统

控制系统是离心机的指挥中心，各种设定的参数通过控制系统来执行。

1. 速度控制

主要包括速度设定、速度测定及速度升降等。速度设定是指在离心前设定离心时所需速度，如果设定速度超过了转头的最大控制速度，控制系统将会把设定速度改设在转头的最大允许速度范围之内。速度测定指离心机启动后通过光电检测器测定运行的真实速度，如果超过了设定速度将停止加速，反之则自动加速。速度升降是指离心机及时的加速和减速制动。

2. 温度控制

包括制冷系统的启动与控制、保温。当离心机腔内的温度超过设定温度时，启动制冷系统使温度降到设定温度以内，反之则自动停止制冷系统。在离心结束后，如果样品没有及时取出，为防止样品因温度变化受到影响，离心机自动将温度保持在设定的范围以内。

3. 真空度控制

包括真空度自检、恒压和消除真空等。有的离心机在启动之前有预置的真空度，经离心机自检并确认已达到了预置的真空度方能启动。离心机在做匀速运动时，通过自动启动或停止油泵来保持一个恒定的真空度。离心结束，速度下降一定转速后，自动消除离心腔内的真空度。

（五）光学系统

超速离心机的速度高达数万转，用机械方法来准确测定超速离心的转速是比较困难的，采用光速则可以准确测得转速。分析型离心机上的光学系统一般采用 Schlieren 系统、干涉系统和紫外系统等。制备型离心机的光学系统一般具有以下功能。

1. 识别转头

各厂家生产的转头的形状、规格、大小及技术参数均有差别，各厂家的转头不能混用，否则容易引起转头在离心时炸裂，带来安全隐患。光学系统可以在离心前对转头进行扫描，并将扫描信号与本机设定的转头比较识别，如发现转头有误，机器将自动提示。

2. 测速

根据样品的沉降系数不同，设定适当的离心速度，并能对速度精确控制，准确测定运行速度是精确控制速度的基础。光学系统通过对转头黑白相间的边缘进行扫描，扫描

信号经计算机处理后，就可以获得离心速度。

3. 沉降状态检测

在密度梯度离心时，将运行中的样品的沉降状态通过光学系统扫描显示出来，以便更有效的控制离心时间，达到最佳的分离效果。

（六）润滑系统

由于超速离心机的离心速度非常高，为了尽量减少轴承和其他机械活动部分产生的机械摩擦、降低转动部分的温度和提高离心速度，而设计了润滑系统。

（七）防护系统

安全防护是离心机设计的最重要的环节，为了确保操作人员的人身安全，避免离心时发生意外事故，离心机都设有安全系统。机械安全设计主要包括以下内容：

1）门锁防护系统采用机械和电子双层门锁，要求门锁关闭后，离心机才能启动，电机停止动后，才可以开盖。

2）离心机腔体和盖采用坚固的装甲钢，以防转头飞逸。

3）转头的不平衡检测至关重要，转头的不平衡会导致电机轴产生摆动，影响离心机寿命，严重时会折断电机轴，甚至炸头。一般会通过检测电机轴的摆钟探知不平衡，常用的方法有：机械位置开关、磁敏电阻（MSR）、超声测距、加速度传感等。

4）转头识别系统可以自动鉴别转头，限制转头的最高转速，有效防止了用户错误操作。转头识别的基本原理是为每一个转头设唯一的编码，或在每一个转头的底部镶嵌一定数量的小磁铁，用霍尔传感，或采用光电折射环传感，更复杂的有超声和无线射频转头识别，转头无需运转即可识别，甚至连转头盖是否该好都能探知。

（八）管理系统

对仪器的使用状态进行记录，计算有关参数，故障诊断示警，设有数据处理程序和转头间的数据转换和沉降程序等，还可进行模拟分离。如日立的α型超速冷冻离心机的自动转头管理系统，可以自动管理转头的寿命，记录转头使用的全过程，免去了记录转头日志等麻烦；故障自动诊断功能可以在误操作或发生故障时迅速报警。

三、转　　头

转头是离心机的重要组成部分，由于转头在高速旋转的条件下，要承受几十万相对离心力的加速度离心力，所以对材料的选择、加工的精度和技术的难度、技术参数和安全系数等的要求非常严格。目前转头的品种有将近50种。

（一）转头的分类

根据转头的结构和用途可以大致分为固定角转头、水平转头、垂直转头、近垂直转头、区带转头、连续流转头和酶标板转头等。还有其他特种转头，如土壤脱水转头、细

胞悬浮转头、细胞清洗转头和血球比测定转头等。

1. 固定角转头

离心管与转头的转轴之间有一固定的角度，角度变化范围通常在 14°～45°。其最重要的参数包括：转头能容纳离心管的容积、转头的最大速度、相对离心加速度等。此种转头是离心速度最高的转头，承受的最大离心力可达 800 000*g*。固定角转头容量大，转头内容纳的离心管多，主要用于差速离心和等密度离心。等密度离心时离心时间较短，分离纯度也较高。

2. 水平转头

离心管装在转头的吊桶里，离心前离心管为垂直方向，离心时离心管处于水平方面与转头垂直，承受的最大离心力为 400 000*g*。可分为密封水平转头和吊桶式水平转头。密封水平转头的吊桶外有一密封套，可防止工作人员受样品污染。水平转头主要用于速率区带离心和等密度离心，壁部效应（分离物质碰撞到离心管管壁上引起的变化）影响小，回收率高，分辨能力强，但沉降距离大，离心时间长。

3. 垂直转头

离心管与转轴的方向平行，目前承受的最高大离心力可达 700 000*g*。离心过程中，离心管中的液层变成与转轴垂直的方向，离心结束后恢复原位，因此，沉降距离最短，离心时间最短，且由于垂直剖面积最大，离心后纯样品区带的容量也较大。垂直转头比较适合用作速率区带离心和等密度离心，尤其适合于质粒 DNA 的分离纯化，但不适合差速离心。

4. 近垂直转头

离心管与旋转轴之间倾斜一个固定的小角度，一般为 7°～9°，承受的最大离心力在 650 000*g* 左右。沉降距离比垂直转头稍大，适合于速率区带离心和等密度离心。尤其是 20 世纪 90 年代以后开始使用的新型转头，用作生物大分子（DNA、RNA、蛋白质等）的平衡等密度离心最佳。

5. 区带转头

区带转头的结构比较复杂，操作起来比较繁琐。其基本结构是由旋转钵、带有 4 个翼的转头心和密封装置等部件构成，离心时不需使用离心管，承受的最大离心力可达 250 000*g*。在进行超速离心时，先在低速（2000～3000r/min）运转的情况下将密封装置安放在转头上，然后通过管道把梯度液注入转头中，形成密度梯度，再通过管道将样品加到转头中的梯度液上，接着将密封装置取下，换上密封帽，将转速提高到所需的速度，进行离心。离心结束后，先将速度降至低速（与开始相对应），用填充液将已分离的区带依次取出，分别收集。区带转头没有壁部效应、分离纯度高、量大，特别适合做大容量的病毒、亚细胞器、生物大分子的速率区带离心和大容量样品的等密度离心，但

操作要求高，转头及整体价格昂贵。

6. 连续流转头

离心杯与旋转轴成固定角度，同时设有进液口和出液口，以便在连续离心的过程中不断补充样液和排出上清液，最大离心力可达100 000*g*。工作原理与区带转头相似，可连续工作，分离量大，分离纯度高，可用于各种生物体的差分，速率区带和等密度离心。近年来高速连续流转头常用于大量发酵液（大肠杆菌、酵母菌）菌体的沉淀。

（二）转头的材料

铸造转头的材料主要考虑两点，一是强度高，坚固耐用；二是质量轻容易提速。但是这两个条件是互相矛盾的，如果要考虑其坚固性，质量就大，考虑其质量，坚固性又较差，因此，转头的材料不同，其性能也各不相同。目前制造转头的材料主要有以下几种。

1. 铝合金转头

铝为两性金属，价格低，取材方便，用它制造的转头最适合于pH6.0～8.0的中性溶液的离心。铝合金转头质量轻，导热性能好，容易加工，在高速离心机和超速离心机转头的制造中广泛使用。但铝合金转头强度不高，容易碰伤，尤其是与高浓度盐长期接触会产生内结晶，与腐蚀性强的强酸、强碱性溶液、有害性金属盐类直接接触，会发生腐蚀，造成损伤，因此铝合金转头使用寿命比较短。

2. 钛合金转头

铝合金转头重量轻、造价低，但抗腐蚀和耐高温性差，钛合金除具备铝合金的优点外，还可以抗腐蚀，对酸、碱溶液（pH3.5～11.0）均适宜；耐高温，可直接进行高压高温消毒，在高温下工作；机械强度高和离心速度高等。钛合金转头导热性能介于钛合金转头和碳纤维转头之间，多用作高速转子的材料，并大有取代铝合金的势头。钛合金转头的缺点是质量大，难于加工，虽然使用寿命长但价格昂贵。

3. 碳纤维转头

为减轻电机的负荷及增加样品的容量，有利于提高速度，许多厂家改进了转头的材料和结构，推出了超轻转头：Beckman和Hitachi推出的碳纤维转头，重量只有铝合金的1/3。碳纤维转头质量轻、强度大、韧性好、耐腐蚀，在偏酸性或偏碱性的溶液中均可使用，适于用作超速和超高速离心机转子的材料。

4. 聚丙烯转头

聚丙烯转头也是一种新型的轻质转头，抗腐蚀耐高温，既可以漂白清洗消毒，也可以直接高压高温消毒，一般多用于低速、高速台式离心机。

（三）转头的主要参数

1. 最大转速

转头的抗拉能力是有限的，这与转头的类型、构造和材料有关系。离心速度越高，转头所承受的张力越大，因此每个转头都有规定的最大速度，一般都标在转头盖上。在使用过程中，设定使用速度时，必须低于转头标定的最大速度，超过了标定的最大速度就有可能使转头发生爆炸。所以在选择转头时，既要根据选择的离心方法确定的转头型号，又要根据离心颗粒所需要的速度或离心力来确定转头的型号。现在离心机都设有过速保护装置，一旦超过了转头的最大允许速度，离心机就会自动报警。在规定的报警时间内如果没有操作人员来处理，离心机就会自动减速或关机。

2. 最大离心力

各个生产厂家生产的转头，在说明书中都会提供转头的最大、最小和平均旋转的半径。转头的最大离心力是根据转头的最大速度和最大旋转半径计算出来的，相对离心力以重力加速度（*g*）的倍数表示。

3. 最大容量

每个转头中可容纳离心管数乘以离心管的最大体积就是该转头的最大容量。当然实际操作过程中，不一定使用最大容量，通常是略低于最大容量，所以说最大容量与转头的大小有关，而转头的大小与转速有关。容量越大，转头越大，转速越低；与此相反，容量越小，转头越小，转速越高。

4. K 因子和 K′因子

K 因子和 K′因子可以用于比较各种转头对所离心材料的分离效果的参数。K 因子用于估计已知沉降系数 *S* 的颗粒，在最大的转头速度下，由最小半径沉降到最大半径所需的时间。*K* 值越小的转头，其离心能力越大，反之则越小。转头 *K* 值在出厂时就被标定了，以表示每个转头的基本功能。K′因子是用来估计颗粒穿过线性密度梯度离心的参数，颗粒在最大速度下沉降到管底所需要的时间。

5. 转头最大允许速度的计算

转头的最大允许速度是选择离心和转数的重要参数。每个转头都只能承受一定的离心力，对旋转速度有严格的规定，因此，每个转头都在显著的位置上表明了最大允许速度。如果离心时使用的速度超过了最大允许速度的 25%，就有可能由于转头承受不了过高的张力而引起爆炸。所以在离心之前应当根据溶液的密度和使用何种材料的离心管计算实际最大允许速度。

1）若使用塑料离心管，样品的平均密度大于 1.2g/ml，则

实际最高转速＝×最大允许速度

2）若使用的是不锈钢管，则

$$实际最高转速=\times(1-25\%)\times最大允许速度$$

其中×为实际最高转速是最大允许速度的倍数

(四) 转头的保养

转头在高速运转时，内部会产生离心应力，当离心应力超过一定的限度后，将引起转头过早失效，甚至炸头，所以一定要注意转头的正确使用和妥善保管。

转头要轻取轻放，防止剧烈撞击，应尽量防止转子被碰伤、擦伤、刮伤，防止产生机械破坏，如不慎将转子失落，应对转头进行 X 光检查，确认内部无创伤后，方可使用。

转子使用中应注意离心管的样品充注量及密封的严密性，要经常检查密封圈是否完好。如果发生老化、破损应及时更换，避免发生漏液，防止有腐蚀作用的溶剂与转子直接接触。同时要防止转子机械疲劳，转头在离心过程中，随着离心速度的增加，转头的金属会随之拉长而变形，在停止离心后恢复到原状态。若长期使用转头最大允许离心速度离心，就会造成机械疲劳。转头在使用过程中如果遇到下列情况应严格遵循厂家的说明，降低转头的最高转速来延长转头的使用寿命：

1）转头的寿命已到，但转头保存良好；

2）转头局部损伤或轻微腐蚀；

3）使用不锈钢离心管和套管；

4）样品平均密度超过 1.2g/ml 时。

转子使用完后要及时冲洗、擦拭并喷涂保护剂，涂抹保护油脂，防止酸、碱腐蚀和氧化物氧化。并将转子存放在干燥的环境中，置于专用架子上，放入柜中或放入装有吸湿硅胶的干燥器内。以免不良环境造成腐蚀，降低转子的使用寿命。

第三节　操 作 使 用

一、离心机的操作

不同型号的离心机功能不同，操作过程也略有差别，但是其基本原则是一致的，即按照离心机物质分离过程中所需要的转速、温度、时间以及分离物质的体积选择合适的转头，设置正确的时间和温度进行离心。下面以德国产 Eppendorf Centrifuge 5810R（最高转速 14 000r/min）为例，介绍离心机的基本操作过程。

1）打开电源，根据待分离物质的容器选择合适的转头，将空转头装上，旋紧后，按下 Start 键，仪器以 7000r/min 转速进行自检，确认转头运行情况良好后方可进行后续操作。

2）进行温度设定，若此时离心腔内温度高于设定值，仪器则会自动进行快速冷却，即“Fast Cool”。

3）当自检和快速冷却结束后，将样品平衡后，对称放入转头的样品槽中（这一点

至关重要，若摆放不平衡，会导致转头损害甚至轴承断裂)。根据需要选择离心速度、离心时间，按下 Start 键，即开始离心（不同型号仪器的设置方式不同，如 BECKMAN 离心机还需要输入转头代码等参数，但基本上所有离心机现在均采用键盘输入方式，简单快捷)。在离心过程中，若需要停止离心，可以按下 Stop 键，仪器自动停止离心。

4）离心结束后，仪器会发出蜂鸣声提示用户，此时将样品取出，关闭电源。若离心腔内壁有冰霜，需要打开盖子，晾干后用吸水性软布擦拭干净，方可盖上盖子，否则会导致不能识别转头等一些仪器故障。

二、操作注意事项

1）严格按照离心机操作规程使用。

2）不允许使用超过转头的最大转数。

3）不允许超过转头所能承受的最大离心力和最大允许速度。

4）绝对不允许非平衡运行。样品应注意重量平衡和对称放置，否则在非对称的情况下负载运行，就会使轴承产生离心偏差，引起离心机剧烈振动，严重的会使轴承断裂。

5）使用时准确组装转头。离心管平衡后对称的放入转头内，转头与轴承固定于一体。防止转头在高速运转时与轴承发生松动，导致转头飞溅出来。

6）不使用带伤的转头。使用前应认真检查转头是否有划痕或被腐蚀，保证转头完好无损。

7）使用前检查转头的使用寿命，如超过了使用寿命应当停止使用。一般情况下铝转头的使用寿命在 2500h 左右或 1000 次以上，钛转头在 5000h 左右或 10 000 次以上。

8）在允许的温度范围内使用，对于铝合金转头的使用温度为 0～25℃。

9）开始使用前切记将离心腔门或盖子及转头的盖子关紧。

10）开机后，当转速还未达到预置转速时，操作者不要离开离心机，直到运转正常，方可离开，不过仍要随时观察运行情况。

11）运行过程中，如出现异常情况，应立即停止，进行适当处理。

12）运行过程中突然停电，必须将电源切断，等待转头慢慢靠惯性减速，直到速度显示为“0”或用耳朵紧贴在离心腔门仔细听听，看转头是否已经减速为 0，确定后手动将离心腔门打开，取出样品和转头。

13）每次使用后，必须将转头取出，擦拭或清洗干净，将其置于干燥的地方晾干。

14）新买的离心机，放置一个转头在 3000r/min 下运行，看其是否平稳，方可进行其他操作。

三、维　　护

1）每周要开机一次，放一个转头在低速的情况下运行 30min，保证离心机工作正常。

2）定期用水平仪放在离心轴或离心机体上看是否水平，若不平则必须调整。

3）每次使用离心机后，必须将转头马上取出，保存好。

4）要定期给真空泵、扩散泵换油，使真空系统正常工作。

5）每次使用离心机，必须做详细记录，一年作一次统计。对于超速离心机，整机及所用转头都有一定的寿命，整机保用160亿转，铝转头可用1000次、2500h，钛转头可使用5000次、10 000h，若达到转头寿命，必须降级或减速使用。

6）离心机的主要附件是转头和离心管等，使用时应严格按其说明书使用，平时应注意它们的清洁、消毒、保养，若转头离心孔底、离心管底或壁上有明显的裂纹，就不能使用。

7）一般不同厂家的转头不能混用，应该是配套使用，否则会减少转头寿命，甚至损坏离心机。

8）只要精心维护离心机，观察运行状态，听声音，早期诊断，及时处理，这样就可以让离心机发挥最大的效率。

四、常见故障

1. 真空度下降

对于高速、超速离心机，大部分都设有真空装置，目的是让离心腔在运行状态时处于中或高真空状态，从而减少对转头的摩擦，使其平稳运行。在真空度下降时，请检查真空系统，一般是机械泵油或扩散泵油不够清洁或过少，将油进行更换，真空度就会恢复。

2. 离心机不工作

一般离心机是采用串激电机来驱动转头，观看碳刷接触是否良好和磨损程度是否严重。若磨损厉害，更换碳刷就能解决问题。对于高速、超速离心机，确认离心条件是否选择合适，检查传感器部分、控制系统和显示单元等，逐步检查就可以找出原因。

对于小型或台式离心机，人们常常会把转头一直放在离心腔里，时间长了转头会卡死在轴上。为了将转头取下，必须用力敲打，这样会严重损伤离心轴，导致转轴扭歪，恢复不了，甚至破坏离心机。

3. 面板故障提示

对于高速、超速离心机，面板上装有故障提示，针对相应的故障提示符去处理，就能解决出现的问题。

第四节　在分子生物学领域的应用

一、制备性超速离心

制备性超速离心可用在去除蛋白质的RNA分离和从大肠杆菌中分离质粒DNA等方面。目前已经建立了多种从细菌中提纯质粒DNA的方法，这些方法一般都包括培养

细菌、收集和裂解细菌、纯化质粒 DNA 三个步骤。收获细菌后，需要从大规模裂解物中制备λ噬菌体颗粒。可以选用 CsCl 等密度梯度离心纯化λ噬菌体颗粒，或者甘油分级梯度离心纯化λ噬菌体颗粒（该方法快速，但所得到噬菌体纯度不高，不应用于储存性原种的制备中）。用蔗糖密度梯度离心和 CsCl 密度梯度离心纯化λ噬菌体的臂。在使用载体的臂作为载体进行克隆或用载体臂构建文库时，密度梯度离心显得非常重要。此外，在分子克隆中，为了获得纯化的质粒 DNA，需要将共价闭环结构的质粒 DNA 与污染的细菌 DNA 片段分开，最经典的方法就是 CsCl-溴化乙锭梯度密度离心，该方法已成为制备大量质粒 DNA 的首选方法。目前梯度平衡离心法主要用于纯化容易带上切口的特大质粒、用于转染哺乳动物细胞的闭环质粒和用于生物物理学测定的质粒。

下面以从大肠杆菌中分离质粒 DNA 为例，具体介绍超速离心在生物大分子分离方面的应用。

从大肠杆菌中分离质粒 DNA 的步骤如下。

1）溶液制备。

溶液 I：50mmol/L 葡萄糖，10mmol/L EDTA，25mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）。

溶液 II：0.2mol/L NaOH，1% SDS。

溶液 III：3mol/L 乙酸钠（pH4.8）。

TE 缓冲液：10mmol/L Tris-HCl（pH7.4），2mmol/L EDTA。

2）*E. coli* 培养液 1L（量大按比例配置）。

3）将 1L 培养液在 4000r/min（约 2000*g*），5℃离心 20min，得到细菌沉淀。

4）用 100ml 冰冷的溶液 I 洗沉淀，再次离心，4000r/min，5℃，20min。

5）用 20ml 冰冷溶液 I 将第二次离心沉淀调成均匀悬浮流。

6）每毫升悬浮液加入 2mg 溶菌酶，并在 0℃冰浴中放置 10min。

7）加入 40ml 溶液 II，轻轻搅拌后，在冰冷中放置 5min。

8）加入 30ml 溶液 III，在冰冷中放置 20min，使蛋白质大部分沉降。

9）在离速冷冻离心机上用角式转头 10 000r/min（约 1000*g*）5℃，离心 15min。

10）小心地倒去上清（不要混起沉淀），在沉淀中加入 55ml 异丙醇，即得到粗制的质粒 DNA 溶液。

11）粗制 DNA 液在－20℃静置 15min 以上，随后 12 000r/min（约 15 000*g*）4℃离心 5min，倒去上清液。

12）真空中抽去异丙醇，沉淀中加入 18ml 经过消毒的 TE 缓冲液，在沉淀溶解后再加入 0.65ml 1%的溴化乙锭。

13）以上溶液每毫升加入 1g 分析纯 CsCl，使其完全溶解，检测溶液折射率应为 1.3890（密度＝1.587）。

14）用以上溶液按照参考文献所介绍的方法进行质粒 DNA 分离。

15）离心后在 300nm 紫外光下可显示 DNA 带、线性 DNA 带和质粒 DNA 带，RNA 沉淀在底部，蛋白质在液面。

16）用参考文献介绍的方法取出质粒 DNA，抽提去掉溴化乙锭透析法或脱质柱去除 CsCl。

二、分析性超速离心

分析性超速离心主要是为了研究生物大分子的沉降特性和结构，而不是专门收集某一特定组分。因此它使用了特殊的转子和检测手段，以便连续监视物质在一个离心场中的沉降过程。

(一) 测定生物大分子的相对分子质量

测定相对分子质量主要有三种方法：沉降速度、沉降平衡和接近沉降平衡。其中应用最广的是沉降速度。超速离心在高速中进行，沉降速度使得任意分布的粒子通过溶剂从旋转的中心辐射地向外移动，在清除了粒子的那部分溶剂层和尚含有沉降物的那部分溶剂之间形成一个明显的界面，该界面随时间的移动而移动，这就是粒子沉降速度的一个指标，然后用照相记录，通过 Svedberg 方程即可求出粒子的沉降系数。

$$M = RTS/D(1-v\rho)$$

式中：M 为该分子不含水的相对分子质量；R 为气体常数；T 为绝对温度；S 为分子的沉降系数；v 为分子的微分比容（当 1g 溶质加到一个大体积的溶液中所占有的体积）；ρ 为溶剂的密度。

(二) 生物大分子的纯度估计

分析性超速离心已广泛地应用于研究 DNA 制剂、病毒和蛋白质的纯度。用沉降速度的技术来分析沉降界面是测定制剂均质性的最常用方法之一，出现单一清晰的界面一般认为是均质的，如有杂质则在主峰的一侧或两侧出现小峰。

(三) 分析生物大分子中的构象变化

分析性超速离心已成功地用于检测大分子构象的变化，例如，DNA 可能以单链或双链出现，其中每一条链在本质上可能是线性的，也可能是环状的，如果遇到某种因素（温度或有机溶剂）DNA 分子可能发生一些构象上的变化，这些变化也许可逆，也许不可逆，这些构象上的变化可以通过检查样品在沉降速度上的差异来证实。

第五节 离心机的进展和发展趋势

离心机自问世以来，经历了低速、调整、超速的变化，其进展主要体现在离心设备和离心技术两方面，二者相辅相成。

变频调速技术在超离心机中的应用，大大简化了超速离心机的结构，提高了仪器的寿命。20 世纪 90 年代以来，国外主要离心机厂商的全部产品，不论超速、高速，还是低速离心机，几乎都采用变频调速的技术。目前变频调速电机主要有异步感应电机、无刷直流电机和可变磁阻电机 3 类。无刷直流电机和可变磁阻电机都已经有相应的产品面世。

以单片微机为核心的微机控制系统使离心机在多功能自动化方面取得了长足的进

步，进一步完善了离心机的使用功能，拓宽了其应用范围。如可变速率起制动、程序变速、直接输入离心力、操作程序的存储和调用、仪器状态的自动诊断、要求尽可能全的显示离心机的参数和状态信息、更加完善的安全保护功能等，有些功能不仅是锦上添花，而且直接影响离心效果，如可变速率起制动和程序变速可以改善区带离心效果和缩短离心时间等。

单片微机的硬件系统包括：操作界面、电机控制界面、温度控制界面、安全防护监控界面和系统监控等。操作界面管理键盘和显示器采用了简单扼要、逻辑性强和参数一目了然的原则，更加便于用户操作和监视运行参数。电机控制界面的输出电机转速的控制信号，采用的转速传感一般有同轴发电机测速、磁阻测速、霍尔器件测速、光电投射和折射式测速。安全防护监控界面主要包括：超速、超温、转头不平衡、转头识别和门锁监控等。系统监控要监制系统自身的状态，及时保护和给出故障信息，方便维修。集成度高、专用及总线在内部的单片机，大大减少了造价，并提高了仪器的可靠性。

离心机设计的安全性和环保性越来越受到重视。各国制定相应的安全标准，如德国的离心机意外事故防护规范。门锁防护系统、转头的不平衡检测、离心机自身的抗不平衡能力和转头识别系统等都已成为机械安全设计的主要内容，规范了离心机的安全设计。制冷系统采用无氟制冷剂或半导体制冷，离心机的减震处理体现了现代离心机的环保设计。此外，作为电气设备，离心机满足相应的电气安全和电磁兼容性（EMC）标准，满足人们对质量和安全日益严格的要求，从而取得更多用户的信任。

转头方面出现了酶标板转头、毛细管头、滚筒头和生物安全头等，种类增多，改进了离心的方法，拓宽了应用领域。随着转头种类的增加，转头的材料和结构也有很大的进展，许多厂家推出了超轻的碳纤维转头和抗腐耐温的聚丙烯头。其他方面，Heraeus公司改进了生物的材质和结构，解决生物转头高速密封差的问题。

经过多年的研究，离心机和离心技术仍在不断地发展和完善，无碳刷电机、多功能、自动化、微机控制、注重安全和标准、提高转头质量和种类仍是今后台式离心机的发展方向。

主要参考文献

戴素萍．2000．离心机的原理、操作及维护．云南大学学报，22：119～121
宋持健，周祥凡．1996．离心机技术进展．中国医疗器械杂志，(5)：302～303
杨云，金绿松，崔滋恩等．2000．离心机驱动结构回顾与展望．机械设计与制造工程，(5)：1～4
余兴明．1994．质粒 DNA 的超速离心分离．生命的化学，14，11～15
赵晓光．1999．台式离心机的关键技术及进展．现代科学仪器，(4)：13～15
郑瑶，卢太白．1999．离心机转子腐蚀的防护．现代科学仪器，(4)：65～66
周先碗，胡晓倩．2002．生物化学仪器分析与实验技术，北京：化学工业出版社．286～307

第二十九章　蛋白质测序仪

蛋白质N端氨基酸序列测定（protein N-terminal sequencing），也称为氨基酸序列分析，是测定蛋白质分子中氨基酸排列顺序的一种分析方法，也称为蛋白质一级结构测定。随着生物化学和分子生物学学科的发展及高新技术在生物学中的应用，蛋白质序列测定技术发展很快。图29-1为ABI公司494型蛋白质测序仪外形图。手工测序既费时，样品消耗又大，而自动蛋白质测序仪，使得测序工作周期大大缩短，减少了样品用量，提高了分析的准确性，已经成为蛋白质超微分析的首选方法。

人类首次完成蛋白质一级结构的测定是在1950年由Sanger采用2，4-二硝基氟苯（DFNB）法，完成了胰岛素51个氨基酸序列的测定。同年，Edman采用异硫氰酸苯酯测定蛋白质N端序列，发表了Edman降解法测定一级结构的氨基酸顺序的论文，该测定方法为氨基酸自动测序奠定了基础。根据异硫氰酸苯酯测定法的原理，在1967年，Edman和Begg设计了第一台蛋白质自动测序仪，为蛋白质序列的自动测定和蛋白质测序仪的商品化生产提供了科学数据和样机。随着蛋白质测序仪的不断改进，蛋白质序列测定周期不断缩短，样品用量不断减少，已经降至微克到纳克级水平。

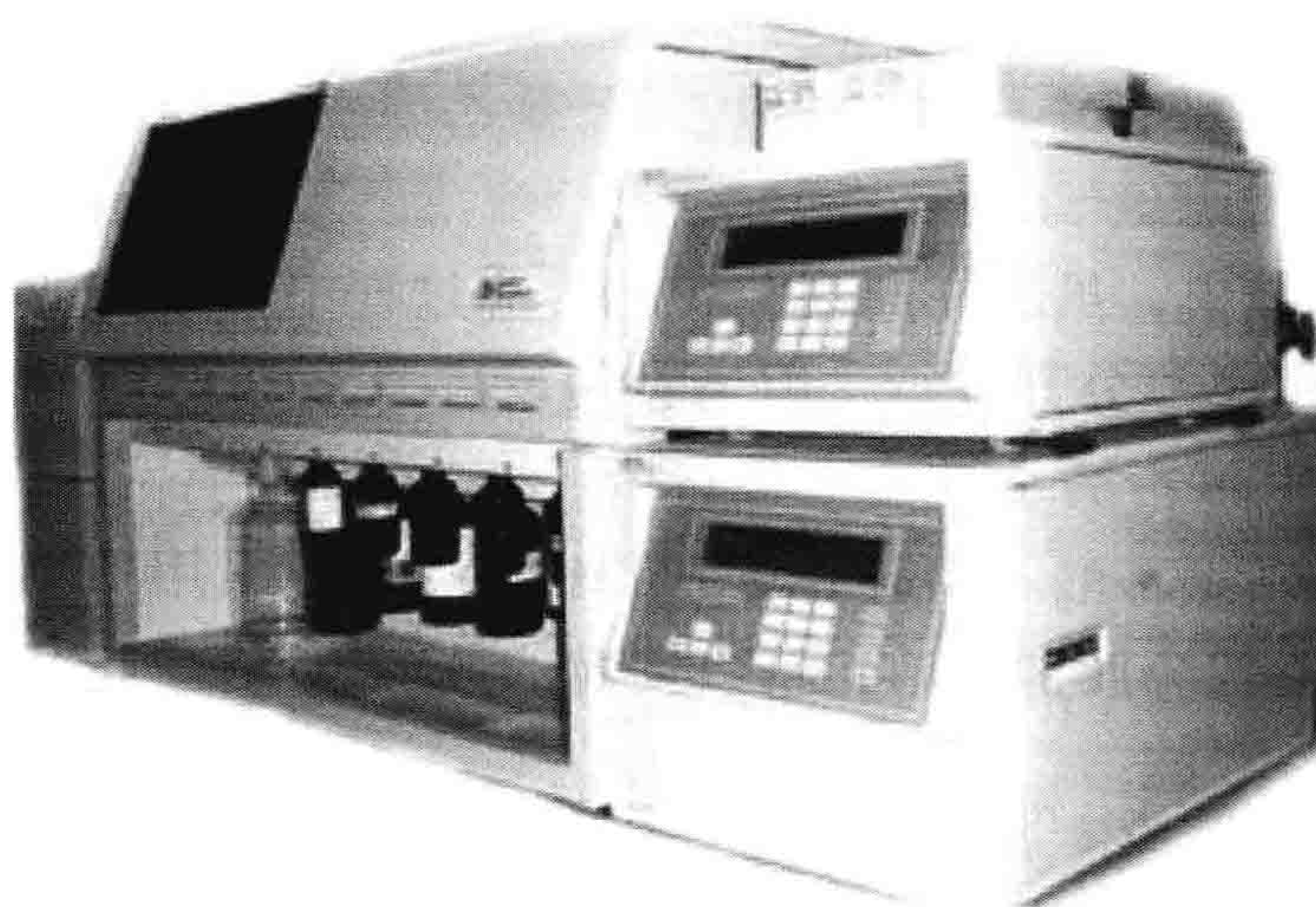


图29-1　ABI公司494型蛋白质测序仪
（来自 http：//www.appliedbiosystems.com.cn）

第一节　基本概念与基本原理

一、基本概念及原理

（一）Edman降解法

Edman降解法是蛋白质N端氨基酸序列测定的核心，该法将蛋白质一级结构中的氨基酸从蛋白质的N端逐个降解下来，并转化成为性质比较稳定的PTH氨基酸，这一

过程称为 Edman 降解法。

Edman 降解法的基本原理是异硫氰酸苯酯能在较温和的条件下与具有自由氨基的多肽或蛋白质发生偶联反应，生成苯氨基甲硫酰衍生物，后者经过环化，并从肽链上断裂下来，然后转变为 PTH 氨基酸，完成一次 Edman 降解。去掉一个氨基酸的肽链或蛋白质又重新与异硫氰酸苯酯发生偶联反应，再次重复上面的步骤。Edman 降解如此反复进行，每次切下来的 PTH-氨基酸通过内置的高效液相层析分离系统，分析鉴定每一个氨基酸。按每次切下来单个氨基酸先后顺序拼接起来就可以获得整个蛋白质或肽的一级结构。测序过程中 Edman 降解反应，主要分为以下三个步骤。

1. 偶联反应

在三甲胺维持的碱性条件下，待测蛋白质或肽分子的 α-氨基与异硫氰酸苯酯（PITC）发生偶联反应，生成苯氨基甲酰蛋白质（又称为苯乙内酰硫脲蛋白质，PITC-蛋白质）。

2. 断裂

获得的 PITC-蛋白质在无水三氟乙酸（TFA）的作用下，水解断裂下一个苯氨基噻唑啉酮氨基酸（ATZ-氨基酸）。

3. 转化

获得的 ATZ-氨基酸非常不稳定，在 10%三氟乙酸水溶液中转化为较稳定的 PTH-氨基酸。

在 Edman 降解过程中，虽然在断裂和转化反应过程中都是在 TFA 的条件下进行化学反应，但这两步反应必须分开进行。因为断裂反应是在无水三氟乙酸条件下进行的，而转化反应是在 10%三氟乙酸水溶液中进行的。若两步合为一步反应，使用无水三氟乙酸的反应条件，ATZ-氨基酸不会转化为 PTH-氨基酸；采用 10%三氟乙酸水溶液的反应条件会使蛋白质的部分肽键分解，所以反应的条件不一样得到的反应产物不同。

4. PTH-氨基酸的鉴定

经转化的 PTH-氨基酸，经过序列仪中内置的高效液相层析或高效薄层层析系统分离鉴定。由于每一种氨基酸在高效液相层析中的保留值不同，将每次得到的 PTH-氨基酸在高效液相层析中测得的保留值与准确 PTH-氨基酸的保留值进行比较，便可确定是何种氨基酸。在测序之前要制作一个标准 PTH-氨基酸图谱。

（二）高效薄层层析分析法

将 PTH-氨基酸通过高效薄层层析（如聚酰胺薄膜层析）分离，依据每一种 PTH-氨基酸在一定的展层剂条件下，其迁移率是一定的，就可以确定其在薄膜上的坐标位置。然后与标准的 PTH-氨基酸在薄膜上的坐标位置比较，便可知蛋白质 N 端切下来的氨基酸。PTH-氨基酸在 268nm 处有较强的吸收。用紫外光照射，即可在荧光屏上看

到，通过电脑自动识别相对位置，即可确定。

将 PTH-氨基酸通过高效液相层析 C^{18} 柱进行分离，每一种 PTH-氨基酸的疏水性有差异，它们在高效液相层析时的保留值不同。根据每次得到的单个 PTH-氨基酸在高效液相层析的保留值与标准 PTH-氨基酸的暴露值比较，便可确定其种类。

二、影响序列测定的因素以及注意的问题

蛋白质测序属于超微量分析方法，因此对仪器、试剂、样品和测试环境等方面要求较高。在 ATZ-氨基酸转化成 PTH-氨基酸时，有时某一个氨基酸残基会产生一个以上的洗脱峰，其原因是在转化过程中有些氨基酸不稳定，会形成少量的衍生物和副产物。下面简单介绍一些：

1）Asn 或 Gln 在反应时常含 10% 的氨基酸残基脱氨，生成相应的 PTH-Asp 和 PTH-Glu，结果会在 Asn 和 Gln 峰附近有 Asp 和 Glu 峰。

2）用 TFA-水系统转化 Glu 时，另一个副产物在苯丙氨酸附近；用 TFA-水系统转化 Asp 时，有另一个副产物在 Vla 之后。

3）Ser 与还原剂 DTT 反应后产生 DTT-PTH-Ser，在 Ala 附近有一个洗脱峰。

4）Thr 与 DTT 产生多个 PTH-Thr 衍生物，出现在 PTH-Tyr 峰的前后，大约有 5 个小峰。

5）Cys 需要经过羧甲基化或其他方式修饰后，才会有洗脱峰出现；若未经修饰或已被糖基化，则检测不到相应的 PTH-Cys 洗脱峰。

6）从层析图谱中还可以看到一些非 PTH-氨基酸的洗脱峰，它们都是 Edman 降解反应的副产物，最常见的有二苯基硫脲（DPTU）、二甲基硫脲（DMPTU）、二苯基酰胺（DPU）。当氩气中含有氧或者漏气时，都会使 DPU 升高。

此外，由于蛋白质测序需要贵重的精密仪器和昂贵的高纯试剂，测试费用较高，所以为了避免经济损失，提高测定的成功率，减少不必要的失误，通常在测定序列之前，对样品进行必要的纯化和理化性质的分析，提供测序时参考，以提高测序的准确性和成功率。

（一）样品纯度要求

待测蛋白质样品的纯度一般都要达到 95% 以上，经 SDS-PAGE 鉴定为一条带，HPLC 分析为一个峰，生物活性保持稳定，不再随纯化方法的改变而提高，分子质量大小一致，氨基酸组成无变化，不含无机盐和其他小分子。如果样品含有少量杂质蛋白，用常规方法难以除去，可以采用 SDS-PAGE 电泳分离，然后将要测序的蛋白质条带转移到 PDF 膜上，再进行测定。

（二）提供样品必要的参数

包括提供蛋白质的分子质量测定结果，以便确定蛋白质测序的长度；提供蛋白质亚基组成的相关资料或相关的辅基；氨基酸组成分析结果，可以确定蛋白质测序的操作程序，以便提高 PTH-氨基酸的回收率。

（三）特殊样品的处理

1. 多亚基组成的蛋白质的处理

若蛋白质中含有两个或多个亚单位或肽链，在测定前必须将其分开成单个亚基，每一肽链作为一个样品单独测定，不能将多个亚基链混合在一起测定。

2. 对二硫键的处理

蛋白质分子中半胱氨酸形成的二硫键最好先经羧甲基化或过甲酸氧化处理，使二硫键还原成半胱氨酸；分子中游离的巯基要进行特殊保护，以防在反应过程中被氧化形成二硫键，从而影响测定，为正确分析测定结果带来困难。

3. 对封闭基团的处理

蛋白质 N 端被封闭，如 *N*-甲酰化、*N*-乙酰化、环化肽等都要进行修饰处理才能进行测定。

（四）特殊蛋白修饰方法

1. 巯基的修饰方法

主要有丙烯酰胺修饰法和 4-乙烯吡啶修饰法两种，都分为还原、烷基化和脱盐三步完成。

2. 去除 N 端封闭基团的方法

如果怀疑蛋白质或多肽的 N 端被封闭，可用不同方法除去一些 N 端封闭的基团。如去除 *N*-乙酰丝氨酸和 *N*-乙酰苏氨酸残基，可将蛋白质吸附在 PVDF 膜上，经蛋白质 N 端序列仪测定几个循环后，在高效液相层析柱上进行检测，若未能检测出 N 端氨基酸残基，可将膜条置于 1.5ml 的小离心管中，加入 50μl TFA 溶液后密封管口并在 40℃ 保温 1h。打开管盖，在通风橱中使 TFA 挥发干净，然后将此膜条放回测序仪中重新进行分析。

第二节　结构与分类

一、组成结构

蛋白质测序仪的结构非常复杂，主要分为 3 大部分，即供气系统、主机和计算机。供气系统包括惰性气体储气瓶、电磁阀、气路管等。主机包括自动进样系统、化学反应系统、氨基酸自动分析系统。计算机主要控制测序过程和报告过程。

二、仪器的分类

目前能够生产蛋白质测序仪的公司很多，如 BECKMAN、ABI、Shimadzu（岛

津)、Waters、Pharmacia 等。仪器的技术指标略有差异，但测定原理基本相同。根据仪器的基本结构和分析方法，蛋白质测序仪大致可以分为 4 类，即液相蛋白质测序仪、固相蛋白质测序仪、气相蛋白质测序仪和脉冲式液相蛋白质测序仪。各类仪器从最初推出的型号到现在都做了不同程度的改进。每次改进都使仪器的灵敏度有一定的提高，测定需要的样品量有所下降，连续测定蛋白质链的长度有所增加，每测定一个氨基酸所用的时间有所缩短。

（一）液相蛋白质测序仪

液相蛋白质测序仪根据 Edman 降解原理自动旋转杯式测定法而建立的，所以也称为旋转杯蛋白质测序仪。如 BECKMAN 公司在 1969 年生产的 890 型蛋白质测序仪，是最早推出的一种型号。随后又推出了 890C、890M 型。该仪器主要采用了自旋式反应器，在其中可以有效地进行反应和充分抽提，适宜于较大片段蛋白质或肽的分析。应用 5nmol 样品，可以连续测定 20～50 个左右的残基，收率为 97%以上。其主要缺点是不适用于分析小肽，因为小肽在有机溶剂中溶解度大，容易从反应杯中洗出。若将小肽固定在载体上，再进行 Edman 降解则可克服这个缺点。液相测序仪的样品用量从最初的 250nmol 到 20 世纪 90 年代只需几十皮摩尔（pmol）左右。仪器的基本工作原理主要经过以下几步：

1）将待测的蛋白质加入到仪器的旋转杯中。

2）在一定条件下进行 Edman 降解，经过偶联-裂解获得 ATZ 氨基酸。

3）旋转杯一边旋转，一边抽真空，除去 Edman 降解时残留的溶剂后，降解的蛋白质和从蛋白质 N 端断裂下来的 ATZ-氨基酸形成薄膜，贴在旋转杯内壁上。

4）通过氯丁烷抽提将从蛋白质 N 端断裂下来的 ATZ-氨基酸提取出来。

5）高效液相层析分离鉴定。除去氯丁烷，将 ATZ-氨基酸转化成 PTH-氨基酸，通过高效液相层析进行分析。

6）N 端氨基酸确定。将从蛋白质 N 端断裂下来的 PTH-氨基酸在高效液相层析的保留值与标准氨基酸的保留值比较，便可确定氨基酸种类。该氨基酸就是蛋白质的 N 端氨基酸。该方法每一个氨基酸残基需要 60min 和大量的纯化试剂。

（二）固相蛋白质测序仪

固相蛋白质测序仪是 1971 年由 Laursen 首先设计出来的，这类仪器主要有 Socosi PS-300 型、Pharmacia-LKB 4020 型、Sequemat 12 型等。该仪器弥补了液相测序仪的某些不足，对一般的小肽（少于 30 个残基的肽），甚至是疏水性肽都能进行序列分析。固相法是先将肽段共价结合到一种惰性载体上，并装成柱，然后按一般的 Edman 降解顺序从 N 端逐级降解。固相载体最初多用聚苯乙烯树脂，近年主要用微孔玻璃球，球表面接有丙氨基侧链，然后在它上面还可连接其他反应基团，以便连接各种不同类型的肽。肽的种类不同（C 端残基或侧链基团不同），结合到载体上的方法也不同。目前固定肽的方法大体有：对苯二异硫氰酸法、高丝氨酸内酯法和水溶性碳二亚胺法。

由于切下一个残基后的肽仍在载体上，不会被溶剂洗掉，可继续进行 Edman 降解

反应。降解下来的氨基酸与母体肽链，只需通过简单过滤即可完全分离，仪器本身及操作也较简单，容易掌握。固相法对试剂要求通常比液相法低，因此处理简便，价格便宜。固相法测序仪的缺点是：肽链共价结合到载体上的收率较低，有时仅有 20%～30%，所以肽与载体的偶联方法及载体的开发仍是目前要解决的问题。近年来，随着 DABITC/PITC 双耦合法应用的广泛深入，已将其应用于自动固相测序仪中，取得良好效果，可以进行微量序列分析。该类仪器的基本原理主要经过以下几步：

1）待测蛋白质固定：通过化学的方法将蛋白质 C 端羧基固定在层析柱上。

2）Edman 降解：经过偶联-裂解获得 ATZ 氨基酸。

3）洗脱：将经 Edman 降解获得的 ATZ-氨基酸用有机溶剂（如氯丁烷等）从柱上洗脱下来。

4）蒸发：含有 ATZ-氨基酸的有机溶剂蒸发除去，得到 ATZ-氨基酸。

5）高效薄层层析分离鉴定：将 ATZ-氨基酸转化成 PTH-氨基酸，通过高效薄层层析分离。

6）N 端氨基酸确定：将从蛋白质 N 端断裂下来的 PTH-氨基酸在高效薄层层析的保留值与标准氨基酸的保留值比较，便可确定氨基酸种类。该氨基酸就是蛋白质的 N 端氨基酸。

这种测序方法的主要优点是防止小分子肽或疏水性较强的肽在有机溶剂萃取过程中丢失，使用试剂的纯度相对不高。但其缺点是蛋白质中的 Glu 因 γ-羧基结合在载体上而无法检测到，Asp 也会妨碍进一步降解反应。

（三）气相蛋白质测序仪

自动液相测序仪和自动固相测序仪在蛋白质序列测定中曾起过积极作用，但随着分子生物学的发展，近来人们深感这两种仪器已不能满足蛋白质微量序列分析的需要。1981 年 R. M. Hewick 等人研制了一种新型测序仪，即气相蛋白质测序仪，也称气液固相测序仪（gas-liquid-solid phase sequenator）。它的特点是弹筒形的反应室代替了液相测序仪中的旋转玻璃杯，反应试剂是在气态下完成蛋白质的 Edman 降解反应。反应室内引入携带体 Polybrene（一种四级氨盐聚合物），能够吸住被测的蛋白质或多肽样品，防止了样品损失，并且不受样品的分子质量大小限制。与固相测序仪不同的是，它不需将样品共价固定到载体上，但样品在降解反应过程中基本上是固定的。该仪器的基本工作原理是通过高纯的三氯乙酸气体，在反应器滤膜上进行降解，然后检测 PTH-氨基酸，主要分以下几步完成：

1）加样：将待测蛋白质溶液加在反应器滤膜上，该反应器是由两个光滑玻璃柱空隙组成，体积为 160μl。

2）Edman 降解：蛋白质与 PITC 反应后，通过纯的 TFA 气体进行降解，获得 ATZ-氨基酸。

3）抽提：切下来的氨基酸残基经氯丁烷抽提，并转移至容积为 1ml 的转化器中。

4）转化：ATZ-氨基在 10%TFA 的作用下转化为 PTH-氨基酸。

5）高效液相层析分离鉴定：PTH-氨基酸被输送到氨基酸分析仪中，采用 HPLC

反相层析法分离。

6）N端氨基酸确定：将从蛋白质N端断裂下来的PTH-氨基酸在高效液相层析的保留值与标准氨基酸的保留值比较，便可确定氨基酸种类。该氨基酸就是蛋白质的N端氨基酸。

这种测定方法的主要优点是：试剂与溶剂都是通过氩气输送，由特殊的阀门自动控制，可以避免试剂之间的相互污染；反应器在恒温器中进行，保证了最佳反应条件，重复性好；试剂和溶剂消耗很低，大约是液相测序仪的1/10；反应步骤分别在反应器或转化器中进行，提高了反应效率；样品用量少，作为序列测定的多肽量最低在5pmol水平，回收率高；缩短了每步降解循环时间，因此提高了效率。此类仪器最多可测55个残基序列，重复收率达到98%，但仪器价格昂贵，非一般实验室所能设置。

（四）脉冲式液相蛋白质测序仪

脉冲式液相蛋白质测序仪是美国应用生物系统公司（ABI）于1986年推出的一种蛋白质测序仪，该仪器吸收了气相蛋白质测序仪的优点，克服了其不足。仪器的基本结构与气相蛋白质测序仪相似，主要分为反应器、转化器和高效液相分离系统等部分。操作步骤同气相序列仪。

脉冲式液相蛋白质测序仪与气相蛋白质测序仪的主要区别如下：

1）通过液相输送TFA及三甲胺，使供应试剂更为精确，更容易控制。

2）在测定过程中可以随时改变反应器和转换器的温度程序及改变蛋白质序列测定的程序，在测定过程中有更大的机动性。

3）设有记忆程序功能，在临时停电时，可以记忆停电前的操作程序，恢复供电后可以继续进行测定。

4）阀门及管道清洗快速方便，减少了残留在阀门和管道内样品对测定的污染。

5）通过电脑自动读出蛋白质测序，计算产率，显示层析时间，打印层析图谱。

上述几种测序仪，各有所长，但是目前用的比较多的是后两种。但随着科学技术的发展，蛋白质测序仪会不断推陈出新，必定会有新型的仪器出现。

第三节　在生物学中的应用

蛋白质测序仪作为获得蛋白质一级结构信息的重要手段，尤其在蛋白质分子结构与功能的研究中占有非常重要的地位。在生物制药、医药领域的用途也十分广泛。

（一）基因工程的研究

可以通过测定蛋白质一级结构或测出部分结构为DNA序列分析找出探针。

（二）蛋白质和肽类纯度鉴定

包括从天然生物材料中提取的蛋白质和多肽、人工合成多肽及基因工程表达的重组蛋白等。例如，利用蛋白质测序仪进行了烟草中铁氧化还原蛋白酶的氨基酸序列测定，

并与其他茄科植物中该酶的结构进行了比较。

（三）蛋白质组学研究

研究蛋白质的结构及功能相互之间的关系及蛋白质结构的同源性，确定蛋白质的生物学活性部位、酶与底物结合及催化位点。例如，目前已经利用蛋白质测序仪和质谱仪联用，进行了蜘蛛毒素 CSTX-1（8351.90Da）和 CSTX-9（7530.25Da）的蛋白质序列测定与结构分析，发现这两种毒素之间存在同源序列，且有相同的二硫键连接方式，这种方式在其他蜘蛛毒素中同样存在。

（四）核酸研究

确定核酸密码中蛋白质序列的起始位点及终止位点，虽然顺序测定可以反推蛋白质的一级结构，但是蛋白质序列分析对确定核酸密码中蛋白质序列的起始位点和终止位点，以及提供蛋白质的乙酰化、糖基化、磷酸化等修饰情况，信号肽或蛋白质源的断裂位点都是必不可少的数据。例如，目前已经利用蛋白质测序仪进行了一种重要的基因调控复合物 GP-9 氨基酸序列的测定，并与 Gp-9 mRNA 的转录产物的测定序列进行了比较。

（五）其他方面

蛋白质测序仪所获得的序列可以科学地解释蛋白质晶体结构、蛋白质分子进化的分支点、分子遗传疾病发病机制和分子免疫的机制等。

第四节　蛋白质测序仪的发展

液相或固相自动测序仪的出现，极大地提高了蛋白质序列分析的效率，迄今已经完成一级结构分析的蛋白质种数已经在 1200 种以上，最长的也超过了 1000 个氨基酸残基。生命科学日新月异的发展，要求测序仪向着快速化、微量化的方向发展。

液相测序仪由于在萃取时样品损失及机械损失等原因，一次连续降解步数只能在 20～40 步，所用样品量也大（通常大于 500nmol），后来在机械上作了改进，如提高反应杯的真空度，但效果不明显。1978 年，在反应杯中引入 polybrene（一种四级氨盐聚合物）后，使一次连续降解步数增至 60 步甚至 80 步，且样品需要量减少为 1～10nmol。20 世纪 80 年代中期以来，固相蛋白质测序技术也取得许多重要进展。为了能适应微量样品（100pmol 以下）的序列分析并使固相化操作更简便，近年来在研制新型载体和改进旧的偶联方法上有了很大进展，其中最突出的是衍生 PVDF（聚偏二氟乙烯）膜载体的应用。PVDF 膜上可引入各种活性基团，能与多肽共价偶联。衍生的 PVDF 膜片通透性好，可被溶剂充分洗涤，使 PTH 氨基酸分析时的背景更清晰，因而提高分析灵敏度。一般蛋白质样品的偶联率在 90%以上，分析 PTH-氨基酸的重复收率在 93%～97%。经 SDS 与双向凝胶电泳分离的蛋白质可通过印迹法转移到 PVDF 膜上，经偶联反应后在膜上形成一有通透性薄层，然后即可进行固相序列分析。该方法对凝胶中相对分子质量为 6000～100 000 的蛋白质样品进行了成功的序列分析，凝胶中蛋

白质的回收率为 38%～52%。1989 年 Milligen 公司推出第二代固相测序仪，该仪器在灵敏度、分析速度和数据处理上较旧固相仪有很大改进，可分析 0.2pmol 的 PTH 信号。对 100pmol 的乳球蛋白进行分析可成功地测定到第 60 个残基。该仪器的很多性能已达到气相序列仪的水平。

目前出现的微柱高效液相色谱（microcolumn-HPLC）技术，由科学家 Ishii 首次提出的，现在已成为 Edman 降解自动序列分析仪分离低微克量蛋白质和肽的基础。普通柱通常为 4.6mm，而微柱液相色谱柱直径小于 2.1mm，它一般重现良好，且用样量少，并能快速地进行蛋白质分析。其流速通常为 10～200μl/min，出峰时间短，峰型尖窄，从而大大提高了检测灵敏度，可达 1pmol；回收率高，因为微柱的载体少，非专一性吸附少。它通常与微量流动池连接，这大大减少了谱带展宽。微柱 HPLC 是目前肽谱分析最灵敏也是最先进的分析技术之一，已广泛应用于肽谱和基因工程产物的分离提纯。

此外蛋白质测序仪与质谱联用，可以获得非常重要的氨基酸序列信息，因此，质谱已成为对小量肽和蛋白质进行测序的有效工具。在目前所建立的肽链 N 端测序方法，即蛋白梯形测序过程中，存在一些难以解决的问题，如亮氨酸/异亮氨酸和赖氨酸/谷氨酰胺分子质量相同，无法区分。目前已可通过负离子质谱跟踪由亮氨酸和异亮氨酸衍生出的乙内酰苯硫脲的 $[M-H]^-$ 离子，建立了区分肽中亮氨酸和异亮氨酸的方法。除了与质谱联用以外，近年来还出现将酶水解、液相色谱分离、串联质谱技术联用并运用计算机算法与数据库中肽的串联质谱数据相对照进行测序的新方法。

主要参考文献

沈漪，方文仪. 2002. 蛋白质一级结构测定的新进展. 中国医药工业杂志，(10)：514～518

陶慰孙，李惟，姜涌明. 1995. 蛋白质分子基础. 北京：高等教育出版社. 105～116

周先碗，胡晓倩，2003. 生物化学仪器分析与实验技术. 北京：化学工业出版社. 235～243

Efficient Primary Structure Elucidation of Disulfide-bridged Peptides ABI 公司 Application Note：Peptide Sequencing Tandem Mass Spectrometry

第三十章　氨基酸分析仪

氨基酸自动分析仪是对游离氨基酸进行分离和定量测定的最普遍、最有效的仪器。它是以离子交换层析法为基础，将 HPLC 和自动化操作有机结合的先进仪器。图 30-1 为美国惠普公司 HP1050 氨基酸分析仪外观图。目前氨基酸自动分析仪已经在快速、微量和自动化方面达到了很高的水平，分析的灵敏度也很高。被广泛应用于生化、制药和食品行业的质量控制、药学研究等领域中，并为这些领域中的技术进步做出了突出的贡献。

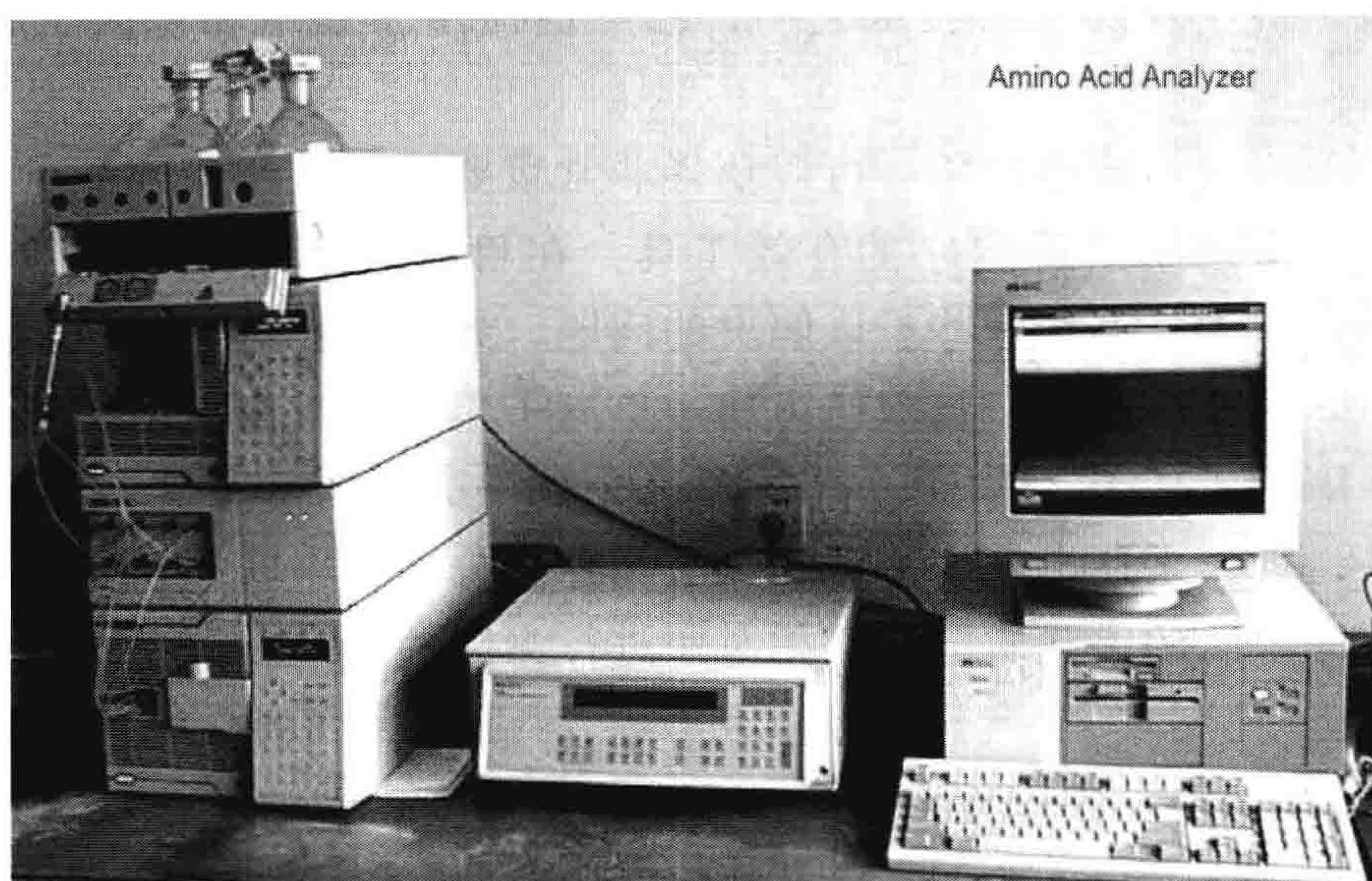


图 30-1　美国惠普公司 HP1050 氨基酸分析仪

（来自 www.instrument.com.cn）

第一节　基本概念与基本原理

一、基本概念

（一）茚三酮法

使用磺酸型聚苯乙烯阳离子交换树脂作为柱材料，在 pH2.0 的条件下，全部氨基酸都能牢固地结合在树脂上。如果提高 pH 和离子强度，可将氨基酸依次洗脱，从而达到分离目的。洗脱下来的氨基酸与茚三酮反应形成紫色产物，可在 570nm 下进行比色测定；蛋白质与茚三酮反应形成的产物为黄色，可在 440nm 下比色测定。

（二）未知样品氨基酸所需系数的获得

为了取得计算未知样品氨基酸浓度所需的系数，先用已知浓度的标准氨基酸混合物

做一次层析分析。分析未知样品时，根据峰位、面积以及标准氨基酸的系数，自动分析仪可算出被测样品各氨基酸的浓度，也可根据被测蛋白质的重量及分子质量计算蛋白质样品的浓度。两个浓度之商即一分子蛋白质中所含的某氨基酸的残基数。

二、工作原理

氨基酸分析仪采用柱后茚三酮法来测定样品中的各种氨基酸含量，即经过前处理的标本从自动进样器进入保护柱进行预分离，然后再进入分离柱分离，并与泵 2 吸入的茚三酮溶液在混合器混合，送入反应柱反应后生成深蓝色的液体，最后送检测器经光电比色计检测标本中各种氨基酸的含量，测试结果直接送入工作站。工作原理如图 30-2 所示。

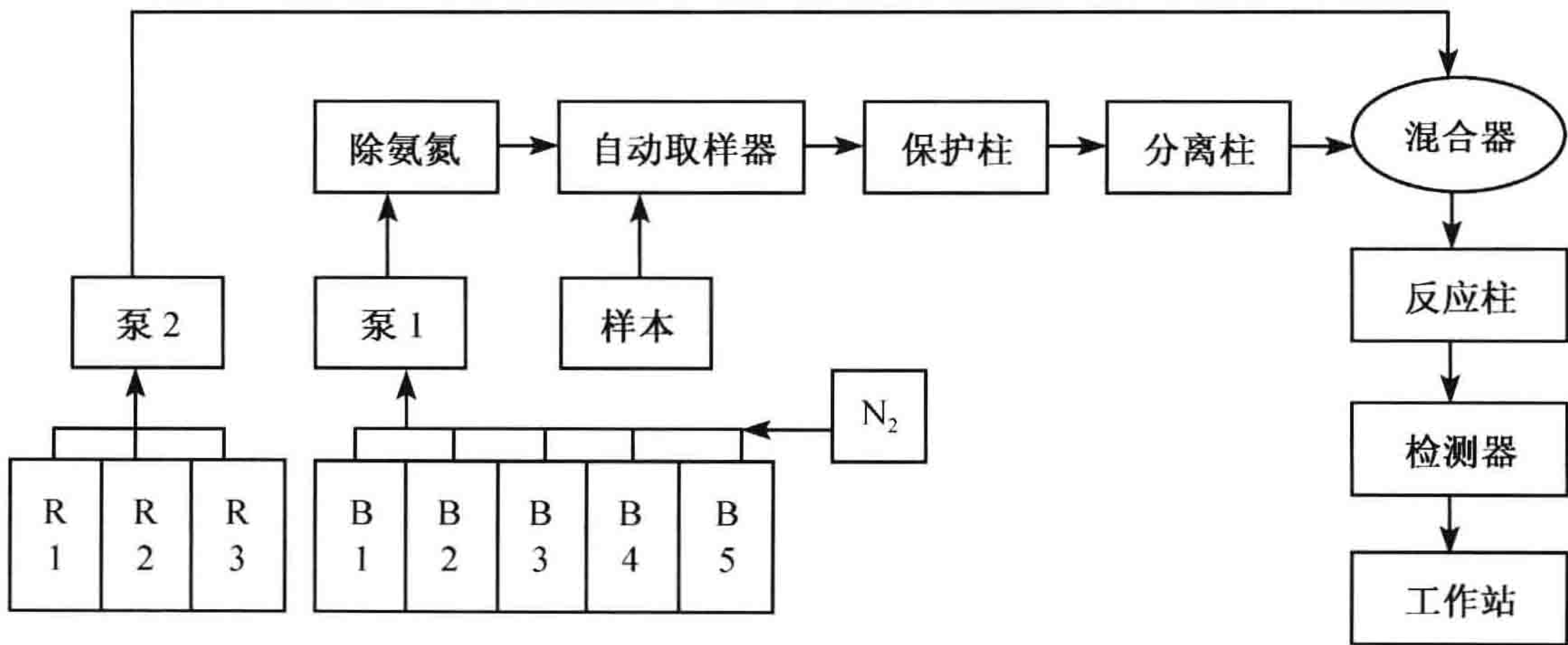


图 30-2　氨基酸分析仪工作原理图

R1：茚三酮溶液；R2：茚三酮溶液的缓冲液；R3：水；B1～B5：pH 不同的试剂

第二节　组成和性能

一、基本组成（以日立 835 氨基酸分析仪为例）

该类仪器主要由电气控制系统与液路控制系统组成。

（一）电气系统

该仪器电气系统控制的核心是两片微处理器及相应的 RAM、ROM 及接口电路。两片微处理器分别是 16 位数据微处理器（IPC-16/500D）和 8 位控制微处理器（SC/MP II ISP-8A/600）。16 位数据微处理器的作用是进行色谱数据处理分析，包括 ADC、TML、PRN、AMP 光电对数放大板、V/F，最终由色谱打印机打印色谱图。8 位 SC/MP 控制微处理器的作用是控制泵 1、泵 2、电磁阀、自动进样器、磁卡读写机、循环水浴以及与 16 位数据微处理器之间的通信联络。

（二）液路系统

液路系统主要由缓冲液罐、缓冲液泵及茚三酮泵、自动进样器、缓冲液分配器、氨

基酸专用色谱柱、流通池、98℃恒温水浴以及循环水浴等组成。

二、不同型号仪器的性能特点

（一）美国戴安公司 AAA-Direct 氨基酸直接分析仪

AAA-Direct TM 氨基酸分析系统最大的特点是：分析方法不同于现存的常规分析方法，氨基酸不需要任何柱前柱后衍生，通过积分脉冲安培检测器（IPAD）被直接检测，而且具有相当高的灵敏度。另外也有相应的高分辨率的微孔阴离子交换柱（AminoPacTMPA10），可用于蛋白质的鉴定和食品分析。另外，AAA-Direct 系统可以用于大规模的细胞培养液和发酵液的在线控制和过程优化。

（二）德国 SYKAM433 型氨基酸分析仪

SYKAM433 氨基酸分析仪由自动进样器、双柱塞式输液泵、双光路光度检测器、具有制冷能力的柱温箱、输送茚三酮的辅泵、四元在线真空脱气机以及溶剂管理器所组成。采用稳定、灵敏的茚三酮柱后衍生法分析氨基酸，既可以完全由计算机控制，又可以人工手动操作，尤其擅长于对氨基酸生理体液（如血清和尿液等）以及水解的氨基酸进行分析。传统型式的氨基酸分析系统需要 4～5 种缓冲液作洗脱系统，而本氨基酸分析仪因优化了缓冲系统，水解液氨基酸的分析只需 2 种缓冲溶液，生理样品仅需 3 种缓冲溶液，还可根据样品的特点独立调节缓冲液的比例。

（三）日立公司 L-8800 氨基酸分析仪

日立 L-8800 高速氨基酸分析仪适用于低浓度的样品分析，检测限达 3pmol。L-8800以 Windows NT 作为工作平台，能够有效地进行自动化控制和数据处理，可使用多种应用软件，并可与 LIMS（laboratory information management system）联网。

（四）美国惠普公司 HP1050 氨基酸分析仪

HP 公司的氨基酸分析仪以高效液相色谱为基础，配以柱前自动衍生装置，可进行伯、仲氨基酸衍生物及其他精细化工方面有关有机物质的衍生化，从而达到分离检测的目的，并可研究反应机制。该仪器配套的化学工作站能够自动采集数据；设定并控制全部参数，包括流速、溶剂组成、梯度柱温及检测波长等；并具有智能化自动积分功能，无论是复杂或简单的色谱图，均可选择合适的积分参数，自动完成积分功能，因此在软件的管理和数据处理方面有较为全面的功能。

第三节 操作使用

一、基本操作

（一）仪器安装调试

仪器安装最好外接稳压器，安装安全阀，防止突然停电造成故障。此外，还需安装

铜板地线，这样可使峰谱基线稳定。仪器各项指标技术的调试采用 18 种氨基酸混合标准液。

1. 氨基酸分辨率的检测

该类仪器要求苏氨酸-丝氨基酸分辨率为 70%以上，甘氨酸-丙氨基酸分辨率为 80%以上，采用 5 个标样检测苏氨酸-丝氨基酸分辨率和甘氨酸-丙氨基酸分辨率，均达到要求方可继续。

2. 氨基酸峰位重现性检测

5 个标样连续多次检测，丙氨酸最高和最低出峰保留时间和精氨酸出峰时间最高和最低偏差均需达到仪器指标。

3. 氨基酸峰面积重现性检测

5 个标样经多次检测，甘氨酸和丙氨酸峰面积重现性偏差平均值均需达到仪器指标。

4. 仪器重复性检测

仪器分离柱重新装入新树脂后，对 10 个标样进行检测，记录 17 种氨基酸（不包括氨峰）的出峰保留时间（*t*），计算峰面积（*A*）的变异系数值、*CV* 值均在某一范围以内（如 1%），说明各种氨基酸面积重现性较好，仪器重复性好。

（二）不同样品氨基酸含量测定

不锈钢分离柱内装有混合离子交换树脂，根据离子吸附交换原理，样品用 6mol/L 盐酸水解法处理后，经自动进样器定量，然后进入分离柱，用流量稳定的泵 1（图 30-2）输送规定的缓冲液，按事先编好的程序卡规定的程序自动淋洗，样品水解后，酸性、中性和碱性氨基酸分别从分离柱上被洗脱下来，各种氨基酸分次与泵 2 输送的茚三酮显色液在混合器中充分混合，在温度 100℃左右的反应浴中进行显色，生成紫色色素（Dr-DA），此紫色发色液经单色分离器的分光光度计，用 570nm 和 440nm 两个波长连续检测，得到的吸光度进行信号放大，记录仪自动绘出各种氨基酸峰谱，以标准氨基酸峰谱为基准，采用峰面积 H. W 法进行结果计算，或通过数据处理系统进行计算打印，得出各种氨基酸含量。

为了检测仪器的稳定性，可选用各种不同样品进行氨基酸含量的测试，和其他氨基酸分析仪测定数据相比判断仪器是否稳定，数据是否可靠。

二、故障排除（以日立公司 835 型氨基酸分析仪为例）

835 型氨基酸分析仪能自动、快速并同时分析多种氨基酸，使用率高，因而具有一定代表性，现介绍如下几种常见故障排除方法以供参考。

1. 泵 2 内部活塞杆连续断裂

故障现象：泵 2 活塞杆断裂，更换新活塞杆后，运行一段时间后又发生连续断裂现象。检查确定轴套内部的滚动钢珠是否正常，表面镀铬层是否脱落，颜色是否呈黑褐色。因为钢珠损耗过大，在运动时受力会不均匀，常导致发生断裂。

处理方法：清洗轴承座，更换大小一致的钢珠。安装新钢珠时注意在轴承内不要将钢珠排满，应留出 1～2 个钢珠位置，并注满润滑油，最后装回轴套，用手轻轻转动偏心轮不应有卡死及松动现象，运行检查是否正常。

2. 电磁阀漏液和黏死

故障现象：氨基酸分析仪在流程中有 7 个（1～7 号）溶液启闭电磁阀，一般在使用几年后均不同程度地出现漏液和黏死现象，使得分析工作不能正常进行。这是由于阀体内的膜片长期运动，使膜片的边沿（固定部分和活动部分的结合部）产生裂缝，因而管道内的液体流入电磁铁连动的阀杆套内，溶液与金属发生反应而黏死。另一种情况是管道中压力较高，使紧固的结合部渗漏。

处理方法：拆下导线及管路，取下阀体，再拆下两只紧固螺丝，先用乙醇把残留溶液清洗干净，对于膜片完好，仅密封不好的情况，洗干净后只需在密封部位涂上液体密封胶，紧固螺丝即可。对于阀杆黏死这种情况不可盲目强行拆卸，这样会使膜片拉坏，应先将整个阀体在乙醇中浸泡 2～4h，待阀杆松动后拆卸，将拆下的阀杆及套中的污物刷洗干净，膜片裂缝不大的可用树脂胶粘合，同样在密封处涂密封胶后装好膜片；已破损严重的膜片需要更换新部件。

3. 循环水浴锅不加温

故障现象：开机后通电，水浴未升温。

检查分析：测加热器两端有无电压，确定加热器本身是否完好，这类问题可能出在温控部分。用示波器观察，是否有触发脉冲，确定控制部分是否正常。再检查电路中是否有断路现象。若温度保险丝熔断，只要仪器水浴温度未有过超温现象，则属正常熔断。

处理方法：更换保险丝即可。

4. 检测放大器损坏

故障现象：进样正常，但不检测。

检查分析：更换比色灯，观察是否检测；若不检测，调基线，观察数字显示有无变化；若无变化，查数据处理部分是否正常，若正常，则故障可能在检测放大器（AMP)。关机，拔下检测器盒 CH1 插头，拆下 AMP 屏蔽盒的两只固定螺丝，抽出 AMP 电路板组件，测电路板电压，查看是否正常，若正常，调节 ZERO 点基线观察有无反应，同时测运放输出，若无电压变化，则可判断该运放存在问题。

故障排除：将运放拆下，换上一只相同型号运放，开机后调基线有数字变化，然后进样，能检测，说明检测放大器内主运放损坏从而引起不能检测。关机装好 AMP 板

后，再开机进样，查看仪器是否运行正常。

5. 仪器启动后打印机不打印文件

故障现象：仪器开机后，打印机不断地作周期打点，约每秒打一下，不执行任何指令。

检查分析：检查打印机是否有问题，若没有问题，可能是 CPU 板 START 信号丢失，测 CN8 插头上的 START 信号，查看是否 START 信号被短路。

措施与效果：重新处理好线头，看开机后仪器是否能自行启动。

6. 色谱图保留时间发生变化，而且有些出现的峰未能分离出来，即发生重叠峰

故障分析与维修：如果缓冲液泵及茚三酮泵工作正常，一般是由某一个或两个缓冲液供给电磁阀阀芯密封不严漏液造成的。电磁阀发生此类故障，多半是使用时间过长，阀芯聚四氟乙烯垫片老化所致。由于没有阀芯垫片配件，在此情况下，只能整体更换。

7. 缓冲液泵无泵压，但泵马达工作正常

故障分析及排除：氨基酸分析仪液路系统是个有机整体，如果液路中有一个环节出现问题，例如，电磁阀未打开，泵的进出口单向阀性能不良，泵缓冲液杆密封圈磨损，出液口至色谱柱入口处漏液，液路中有气泡等，都会造成柱前压上不去或完全没有压力。用先低压端后高压端的办法进行检查，确认是否为泵杆密封圈漏气所至。若泵杆密封圈被压得过紧，不仅使密封圈磨损过快，而且也可能出现泵杆断裂的现象。另外，该仪器低压流路部分的连接头均用尼龙棒制成，对于使用 10 年以上仪器，尼龙接头都有不同程度出现老化现象，拧紧接头时，千万不要用力过度，否则接头部分前端就会断掉。如果不慎出现连接尼龙头断掉情况，可用尖锥慢慢地挑取出断头碎片（不可用电钻取出），剪去管线前端密封垫，去掉连接头，换上新尼龙连接头，用厚 3mm 橡皮做一个密封圈，装上拧紧即可。

8. 开机后，闭合泵开关，茚三酮泵电机工作正常，但缓冲泵电机不工作

故障分析与维修：泵电机是否运转，除了与其自身性能好坏有关外，还与 SC/MP 板上的逻辑驱动电路及继电器板上的相应直流继电器有关。检查 SC/MP 板上逻辑电路及相应继电器是否动作正常，送至电机 100V 电压及启动电容是否正常，若均正常，可确定故障原因是由电机损坏引起的。检查是否由于电机转子不能转动，若不能转动，用表检查其启动、运转绕组是否正常。由于该电机为铸铝外壳，前端盖及后端盖均为机器冲压密封，属一次性结构，一般无法打开，只能更换新品。一般而言，转子被卡住导致不转，主要是泵电机长期运转（10 年以上），转子上的前、后轴承磨损，锈蚀及严重缺油造成，此时，只要换上两个新轴承即可。

9. 反应池水温沸腾，不能控温

故障分析与维修：根据氨基酸分析的要求，反应温度应控制在 98℃，如发生沸腾，

说明温控电路发生故障。故障若为热敏电阻传感器温度玻璃珠破裂造成温度失控，需用国产器件替代。

三、日常维护

氨基酸分析仪常见的流路故障主要是“堵”和“漏”两个方面，下面介绍一些日常维护的要点。

（一）防治杂质进入仪器

杂质进入仪器的渠道主要是从进样器随样品进入或随缓冲液进入，或随进样器洗涤液进入。根据这 3 种情况需采取相应的措施。首先，需严格按照程序处理样品，特别对生理体液样品，加沉淀剂一定要过量，充分离心，一定要用 0.22μm 超滤膜进行超滤后方可上机，以防树脂的污染和柱头的堵塞。其次，缓冲液也应该按照程序配制，先用 360 目的尼龙纱网过滤缓冲液（粗滤），再用全玻璃的溶液过滤器装上 0.45μm 的微孔滤膜进行超滤，配制茚三酮的缓冲液也应按上述程序进行。最后，进样器洗涤液工作时，要每日更换洗涤液；为了防止灰尘、昆虫或其他杂质等异物的落入，最好制作一个有机玻璃罩，罩在自动进样器上面，并在面罩前部下边 20cm 处留一个小孔，以便引入吸样泵与吸样针之间的连线。

（二）管路及部件的清洗

由于吸样泵止逆阀和泄液管中常常存有氨基酸样品的残余物，在室温下很容易滋生细菌和霉菌，还会有密封环的碎屑，这些异物的存在，可造成管路不畅、泵阀关闭不紧，进而导致采样量不准，影响测定结果的准确性，甚至还可能完全堵塞管路。因此吸样泵阀及泄液管的管路需要经常清洗。

清洗吸样泵阀时，先将吸样泵止逆阀取下，放入超声波清洗池中，在 30℃左右的温水中加几滴洗洁精，超声清洗 10～15min。如仍不干净，可将阀体拆开清洗，冲洗干净后，再组装上（注意安装方向）。

在每次关机时，可将泄液管从阀上卸下，用玻璃注射器（50ml 以上并选用适当型号的针头）先用去离子水注射清洗，再用 75％乙醇注射清洗。如果管路中沉积物太多，不易清洗干净，或管路已完全堵塞，可将泄液管盘起放入超声波清洗池中，在 40℃温水超声清洗 10～15min，清洗时用注射器反复推抽，使管路里面的沉积物逐渐松动，最后完全清除。必要时还可配合细铜丝等工具的使用，将沉积物捅开。在突然断电又不能在短时间内来电的情况下，为了防止反应盘管中发生堵塞，也可采用注射器注入去离子水的方法清洗反应盘管。

（三）分析柱及去氨柱的保养

柱子的保养主要包括样品及试剂的处理和以防污染和堵塞柱子的再生处理。合理的再生能有效地清除树脂及过滤器中的残余物，以减少因树脂污染和过滤器堵塞而引起的噪声，使仪器能够经常在较低的压力下工作，降低泵的工作负载，延长分析柱的使用寿

命。在其他情况正常时，最明显的判定分析柱再生好坏的特征就是观察泵的工作压力，再生较好时，泵压波动较小且工作压力较低。再生的方法如下：开机后运行吸样泵清洗程序，然后，运行分析柱再生程序。在运行此程序时应注意，一定要事先将缓冲液泵的泄液阀打开约 5min 后，再将其关闭。这样做可将缓冲管里的残留液置换出去，还可较快地使分析柱的压力降低。待实验结束关机前，再运行上述程序一次（约 30min）。

此外，管路拆卸越频繁越容易泄漏。由于经常拆卸管路的不锈钢接头处，使得锥形密封及密封环变形，而这种变形是不可逆的，当重新连接时，常因结合不好而发生漏液。此外，由于在排除柱头堵塞和树脂污染的故障时，都需重新装柱，这就要造成树脂的损失，增大分析成本。所以，对氨基酸分析仪的保养一定要注意防治杂质的进入。只要平时严格按照上面介绍的有效措施对仪器进行保养，就可大大提高仪器的使用寿命，降低分析成本，提高工作效率。

第四节 在生物学领域的应用

一、在抗生素发酵研究中的应用

在抗生素发酵过程中，氨基酸是影响生物合成的重要因素。缺乏监测发酵过程的分析手段是发酵研究的障碍之一，国内监测发酵过程氮源变化的普遍方法是测定氨基氮，但这一方法对于所加的氨基酸被菌体利用的情况、开始利用的时间、利用的量、利用的速度等重要问题无法给出准确的定性、定量数据，使发酵研究缺乏科学性。氨基酸分析仪能够很好的解决这些问题，如日立 835-50 型氨基酸分析仪，最小检出量为 10～11mol/50μl，定量测定重现性 *RSD* 值小于 2.5%，1 张图谱最多能分离分析氨基酸及其衍生物近 40 个，完全能满足发酵研究的要求。

除上述问题外，氨基酸分析仪在抗生素发酵研究中还可用于确定被菌体利用的氨基酸品种；测定任意时刻发酵液中氨基酸的含量，菌体细胞内氨基酸的变化以及细胞内外氨基酸。氨基酸分析仪配合液相色谱仪，通过测定相关物质还可进一步弄清菌体所利用的氨基酸在生物合成中所起的作用。

二、对多胺的分析测定

除了目前的薄板层析法、柱层析-电泳法、高效液相色谱法以及酶法与放射免疫法等测定多胺的方法，氨基酸分析仪也可用于多胺的分析测定。这一方法速度快，耗用样品少，重复性好，而且更进一步开发了氨基酸分析仪的使用功能，扩大了其应用领域。采用高 pH 的流动相及梯度程序洗脱的方法，使所有 3 种多胺的洗脱仅需不到 1h 就可以全部完成，明显比其他方法快速、简便，因此在医学诊断等方面具有广泛的应用前景。

三、对胆汁糖蛋白的定量测定

糖蛋白对胆固醇结石的生成有促进作用，但目前精确测量糖蛋白尚有困难。利用氨

基酸分析仪测定氨基己糖含量，步骤简单，操作误差小，节省时间，结果稳定且准确，已成为研究胆汁中糖蛋白含量的有效手段。

此外，氨基酸分析仪还可用于血液、尿、脑脊液等生理体液的分析，对肝脏、肾脏、消化道、脑等疾病进行检测以及遗传疾病的检测以及用于食品工业和药品工业的控制及其研究，同时适用于农产优良品种的选育及其饲料等方面的研究开发。

第五节　氨基酸分析仪的发展

大部分氨基酸分析仪所使用的柱后茚三酮法主要缺点是操作复杂和影响因素多，如柱后衍生需要柱后衍生反应的附加装置和衍生试剂。柱前衍生虽然克服了柱后衍生的一些缺点，但存在氨基酸衍生物不稳定，衍生反应的副产物和试剂本身干扰等缺点。美国戴安公司新近推出的氨基酸直接分析方法采用阴离子交换法分离，利用积分脉冲安培法检测，无需将待测氨基酸转变成可被检测化合物的衍生反应。

氨基酸直接分析用疏水性薄壳型阴离子交换树脂为固定相，碱性溶液为流动相，流动相由水、氢氧化钠和乙酸钠溶液组成，利用阴离子交换分离。碱性 pH 条件也是氨基酸在金电极表面进行氧化反应，实现积分脉冲安培检测的必需条件。

在高 pH 溶液中，含有 NH_2 基团的化合物可在金电极上被氧化，因此可用电化学法检测。积分脉冲安培法中加到工作电极上的是一种自动重复的电位对时间的脉冲电位波形，其与脉冲安培的不同之处在于采样时的电位不是恒定的，而是在高低值之间扫描。在高电位时，氨基和金电极同时发生氧化，在高电位时所形成的氧化金在低电位时被还原。因为在低电位时金的氧化是可逆的，而氨基的氧化是不可逆的，因而来自金电极氧化的信号被大大抵消，由积分整个高低循环的电流所得到的信号仅仅是被分析成分的信号。

检测氨基酸和氨基糖的积分安培波形首先用负电位作为清洗电位，这样可较好地保持电极的清洁和活性，不会引起电极和信号的损失。对检测氨基酸和氨基糖的施加电位波形的优化可克服基线漂移，能够改进线性、信噪比和长时间的重复性，而且不损坏金工作电极。此方法已广泛用于蛋白质和肽的水解产物，食品和饮料等样品中氨基酸的分析。与经典的茚三酮光度检测法进行比较，结果无显著差异。这种方法简化了色氨酸等的检测，因为用盐酸水解样品时，色氨酸会分解，而用 NaOH 水解时，由于柱前或柱后衍生反应的需要，必须经中和后方可进行衍生反应和进样分析，而用直接分析方法，用 NaOH 水解后可直接进样。该法还可以一次进样，同时分析氨基酸、氨基糖和糖类，成为氨基酸分析仪未来有前景的分析原理。

由此可见，为了克服柱前、柱后茚三酮法的主要缺点，目前氨基酸分析仪的主要发展趋势为简化操作步骤、提高检测精度、减少实验影响因素等几个方面，随着新技术、新理论的出现和应用，一定会出现更加可靠、方便、快捷的氨基酸分析仪，为氨基酸分析工作提供更加有力的帮助。

主要参考文献

胡亮，冯靖祎. 2003. 日立 L-8800 氨基酸分析仪的工作原理与常见故障维修. 医疗设备信息，

(9)：70

李荣，王新慧，祝学光．1994．用氨基酸分析仪对胆汁糖蛋白的定量测定．北京医科大学学报，(6)：487

牟世芬，丁永胜．2002．氨基酸直接分析法原理及应用．现代科学仪器，(2)：11～14

陶慰孙，李惟，姜涌明．1995．蛋白质分子基础．北京：高等教育出版社．88～90

王冀平，李亚南．1998．氨基酸分析仪对多胺的分析测定．科技通报，14 (4)：243～250

王杨军．2000．日立835氨基酸自动分析仪的原理及维修．现代科学仪器，(6)：53～55

王正纲，王岩军，张敏等．1996．日立835型氨基酸分析仪故障维修．分析测试仪器通讯，(2)：113～116

徐晓峰．1995．835氨基酸分析仪使用调试技术．生物技术，5 (6)：38～39

鄢家林，林进龙．2002．氨基酸分析仪在抗生素发酵研究中的应用．中国医药工业杂志，(4)：202～205

张明．1997．日立835-50型氨基酸分析仪的保养．氨基酸和生物资源，19 (1)：54～55

第八篇　检测与观察系统

在任何一门学科中，检测和观察系统的发展对于整个学科都具有不可限量的推动作用。尤其在现代生命科学的发展历程中，无论是当初细胞的发现，还是现在诺贝尔奖的获得者利用核磁共振技术进行生物大分子结构的探索，无不说明生命科学研究进入分子水平后，更加需要有精密的高分辨率检测和观察仪器来推动科研的进展。本篇将详细介绍组成生物学实验室的检测与观测系统的各种仪器，包括 pH 计、凝胶成像系统、核磁共振波谱仪、紫外-可见分光光度计等。

第三十一章　pH　计

pH 计，又称酸度计，是一种常用的理化分析仪器，主要用来测量溶液的酸碱度值，即 pH，同时也可用来测量两电极之间的电位差，在生物、化工、医学、环保地质、海洋、科研和工农生产各领域应用极其广泛。图 31-1 为智能型酸度计外形图。



图 31-1　德国 Sartorius 酸度计 PP 系列

第一节　原　　理

pH（酸度）计是以电位法测定溶液中 H^+ 活度的仪器。pH 计所测量的 pH 是用来表示溶液酸碱度的一种方法，它用溶液中 H^+ 浓度的负对数来表示，即 $pH = -\lg[H^+]$。pH 计型号多样，但其结构大体相同，包括电计和电极两部分。电极的主要作用是将被测溶液的酸碱性等信号转化为电位值，电极的电位随溶液中 H^+ 浓度的变化而变化；电计的作用是将电极转换的电位值等信号放大处理并指示（显示）出 pH 等数据。通常，电计有 pH 档和 ±mV 档，pH 档用于 pH 的测量，±mV 档可作为离子计，配上专用电极，用于测量特定离子浓度。±mV 档实际上就是直流毫伏电压表，而 pH 档则是经过特定温度补偿的直流毫伏电压表。在实际测量中，电极浸入待测溶液中，将溶液中的 H^+ 浓度转换成 mV 级电压讯号，送入电计。电计将该信号放大，并经过对数转换为 pH，然后由毫伏级显示仪表显示出 pH。

pH 计一般以玻璃电极为测量电极，甘汞电极为参考电极。氢离子浓度变化所引起的玻璃电极电势的变化，造成了其与甘汞电极之间电势的变化，应符合下列公式：

$$E = E_0 - 2.3026RT/F$$

式中：R 为气体常数；T 为绝对温度；F 为法拉第常数；E_0 为电极标准电动势。由公式可以看出测量 pH 时温度也是一个重要的影响因素，在测量时应考虑温度的变化。

第二节　组成及特点

一、组成结构

目前，pH 计常用的电极多为玻璃电极和甘汞电极的复合电极。pH 计的组成结构如图 31-2 所示。

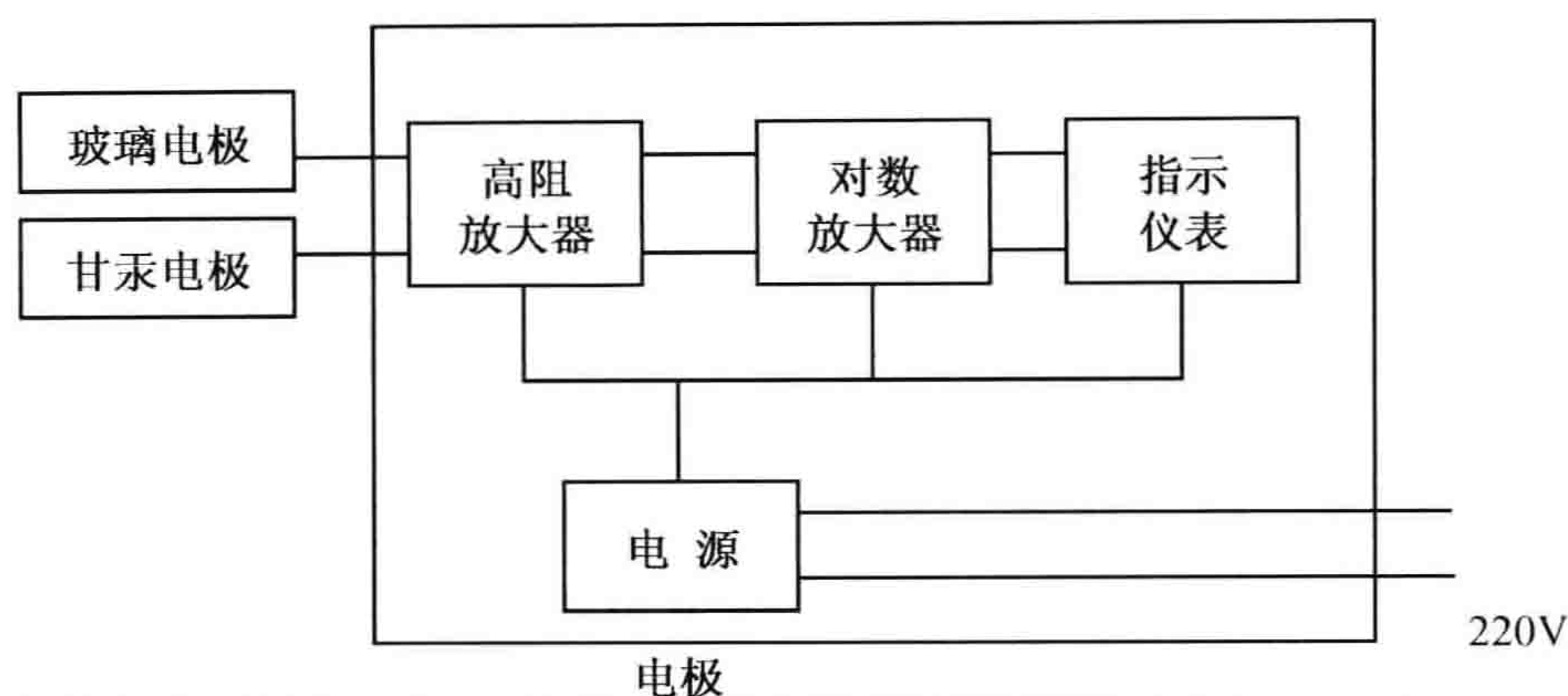


图 31-2 pH 计的结构

二、有关附件的作用及其配置

pH 计的附件主要是测量电极。常用的有玻璃电极、氢醌电极与锑电极等。氢醌电极只适用于测量酸性和弱碱性溶液；锑电极的稳定性较差；玻璃电极在相当宽的范围内有良好的线性关系，并能在较强的酸碱溶液中稳定工作，一般工业上都使用玻璃电极作为测量电极。

玻璃电极在蒸馏水或酸性溶液中长期浸泡后，不对称电位会大幅下降，而且使用一段时间后会稳定在某个数值上，所以玻璃电极在不使用时，一般都在护套内充满蒸馏水，将玻璃球浸泡在其中。

常用的参比电极有甘汞电极、Ag/AgCl 电极等。甘汞电极易受温度变化的影响；Ag/AgCl 电极的结构简单，并耐高温。

三、不同种类仪器的特点

pH 计种类繁多，型号规格各不相同，有指针式、数字式和袖珍式等。现在介绍几种常用的 pH 计。

（一）一点标定型 pH 计（台式）

目前市售 pH 计绝大部分属于此类。使用时先将 pH 玻璃电极浸入与待测液 pH 相近的第一种缓冲溶液（如 pH4.01），调节定位旋钮到该缓冲溶液的理论 pH 指示值 4.01。将电极清洗后浸入样品液，此时仪器所指示的 pH 即为试样的 pH。若在测定样品液之前还在第二种缓冲液（如 pH10.01）中测 pH，此时往往不能显示理论值 10.01（绝大多数情况不小于 10.01），其原因是该电极的斜率不能达到理论斜率（即小于 59mV/pH）。这样不得不调节斜率补偿旋钮，使显示值为 10.01。若再次在第一缓冲液中测量，又不能显示 4.01（绝大多数情况下大于 4.01）。采用这类 pH 计进行测量，虽然仪器的精度可达±0.01pH，而实际的测量误差有可能大于±0.01pH。

（二）带微机处理机的数字式 pH 计（台式）

该类型 pH 计是两点自动标定，因而不必像上类 pH 计那样调节斜率补偿旋钮。具

体操作是，先将pH玻璃电极浸入第一种缓冲液（如pH4.01），然后必须再将电极浸入第二种缓冲液（如pH10.01），最后再测定样品的pH。若仅将电极浸入第一种缓冲液，则无法对样品进行测定。这类仪器最大的优点是，即使pH玻璃电极不能实现理论响应，但总能自动地将在两次缓冲溶液中测得的mV值自动地“两点成一线”，只要样品的pH在这两点之内，均能自动地、准确地显示样品液的pH，不再存在斜率补偿问题。

（三）便携式pH计

最简便的便携式pH计是手握式pH计。这类pH计的主要特点是经济实用，便于携带；液晶显示，防水键盘；微处理器控制，切换方便；一般随机提供可立橡胶保护支架。

第三节 操作使用

一、使用方法

pH计作为一种计量器具，只有正确使用才能确保得到准确的检测数据。不同pH计的使用方法不同，有的需要调零、校准；有的需要多点校准。不管哪一种pH计，在长时间使用之后，为确保其准确可靠，必须采用标定的方法确定其准确度，以保证其计量性能准确可靠。

标定所使用的溶液为标准缓冲溶液，常用的有3种：①B4：0.05mol/kg的邻苯二甲酸氢钾溶液，25℃时pH为4.003。②B6：0.025mol/kg的混合磷酸盐溶液，25℃时pH为6.864。③B9：0.01mol/kg的硼砂溶液，25℃时pH为9.182。

配好标准缓冲溶液后，即可进行标定，一般应用上述3种标准缓冲溶液逐一进行标定。部分型号的pH计有4/9转换档，应先用B6标准溶液（pH为6.864）进行标定。若需测量的溶液是碱性溶液，需先将pH计调至“9”档，用示值为9.16的B9标准溶液进行标定；若需测量的溶液是酸性溶液，需将pH计调至“4”档，用示值4.00的B4标准溶液进行标定。标定后的示值，应与标准溶液的pH相符，或在允许误差范围之内。这样，便可以对待测溶液pH进行测试了。

如果在标定中，pH计的示值超出允许误差范围，需要对其进行检修调整。如果出现示值缓慢漂移，偏离标识值，极可能是电极故障造成。pH计在长时间的使用过程中，测量强碱、强酸以及有机大分子物质等溶液，使电极失去活性，致使pH电极玻璃球泡的微孔堵塞，从而导致示值失准。对于此类问题，可以先更换一个经检测合格的电极后再进行标定，看其示值是否准确，若准确，证明电计是完好的，只需更换电极。或用适当方法使电极复活。若更换电极后示值仍不准确，就要考虑电计的问题，可把电计送当地计量部门检修。

二、仪器的维护

pH计在使用过程中应注意维护保养，以保证其长期准确、可靠。

1）保持仪器输入端插口的清洁，不使用时应将短接线接入，以防止灰尘进入。

2）玻璃电极的玻璃球泡玻璃膜极薄，容易破碎，切忌与硬物相接触。对于非复合电极，安装时一定要使甘汞电极长出玻璃电极的球泡头部，以使球泡不会碰到杯底。

3）短时间测量时，一般预热不短于 5min；长时间测量时，最好预热在 20min 以上，以便使其有较好的稳定性。

4）甘汞电极内部的氯化钾溶液保持在 2/3 左右，且内部氯化钾溶液必须保持饱和状态（有晶体析出）。

5）测量时必须注意控制溶液的温度变化，如果温度偏移较大（±5℃）但较稳定，可用 pH 计面板上的温度补偿器来调节。

6）pH 计电极的使用要点。

• 使用维护玻璃电极时，应注意以下几点。

a. 玻璃电极初次使用或久放后重新使用时，应在蒸馏水或 0.1mol/L 的盐酸中浸泡 24h 以上。

b. 玻璃电极不宜在较强的酸性、碱性溶液中长时间测量，不宜在高温下使用，否则会使电极老化，缩短使用寿命。也不宜同无水乙醇等脱水介质接触，以免其表面失水影响其性能。

c. 使用前检查电极的玻璃薄膜有无裂痕、气泡或斑点，辅助电极应浸入内液而无气泡隔断，安装时应使其下端略高于参比电极。

d. 测量黏度较大的溶液时，应尽量缩短测量时间，以免污染电极，使用后应立即仔细清洗电极。

• 使用维护甘汞电极时，应注意以下几点。

a. 应经常向电极内添加饱和氯化钾溶液，但切勿添加过量的氯化钾晶体，以免堵塞盐桥。

b. 如甘汞电极内氯化钾溶液出现混浊和发黄现象，应停止使用并更换同型号电极。

c. 使用时应使电极内的氯化钾液面高于被测溶液液面 1cm 以上，防止被测溶液扩散到电极内，污染电极。

d. 如被测溶液中含有能与氯离子生成沉淀物的成分，应在甘汞电极的盐桥和被测溶液之间加第二盐桥，例如，采用硝酸钠、硝酸铵等其他电解质过渡盐桥与被测试液相接触。

此外，还应注意 pH 计上温度补偿器的温度值以及外界因素的影响等。

三、pH 计的检修

pH 计的检修主要有以下几个方面。

1. 外观检查

对 pH 计进行整体检查中，外观检查至关重要。避免盲目乱动。对于电极内部线路，要检查所有元器件线路的完整性和良好性，检查缺件、烧焦、短线等明显的损坏情况。

2. 通电检查

pH 计开关接通后，电源方面的故障常表现为指示灯不亮或虽有指示灯显示，但整机或局部不工作。对于这类故障首先要排除外部电源问题，其次检查内部电源故障，依次检查稳压输出、整流、滤波环节，用万用表测量各环节与电路规定值是否相符，查出损坏元件，更换即可。

3. 区分故障

用一根导线把“＋”、“－”极短接（有短接帽的直接接上即可）。若仪器调节恢复正常，可判断是电极问题，否则为电计问题。

4. 电极检修

电极是最容易出现问题的地方，常见故障有：玻璃电极表面有裂纹、破口，内部有气泡、液位高度不够等，甘汞电极内部溶液污染、泄漏孔不畅通。玻璃电极表面污染可采用“活化”处理，将它浸泡在 0.1mol/L 的 HCl 溶液中 12～14h，处理后用清水处理。对于无法修复的电极只能更换。

5. 电计检修

对于输入部分，通电后，应观察表头和调节器。对于放大器部分，故障常常出现在标准电压环节上，应一一进行检修。

第四节　在分子生物学领域中的应用

pH 计在分子生物学领域的广泛应用，现举例进行说明。

一、测定食品中的蛋白质

蛋白质对人体生长、发育的影响极为重要，在食品工业中需要用简便、快速、准确的分析方法测定食品中的蛋白质含量。目前多采用经典的凯氏定氮法，但操作繁琐、费时。甲醛法快速、简便，被广泛应用于农业的总氮分析中，而在食品工业的应用则受到限制。现根据甲醛法的原理，在用 NaOH 溶液中和的试样消化液中，加入中性甲醛溶液，以 pH 计替代指示剂指示滴定终点，进行酸碱滴定，可测定食品中蛋白质含量，简化了测定手续，获得较满意的结果。

二、应用高精度 pH 计测定植物的光合速率和呼吸速率

叶片是植物进行光合作用、制造和输出有机物的最重要的代谢源。叶片的光合速率大小及其呼吸代谢强弱将直接影响植物体生长、发育过程。因此，叶片的光合速率和呼吸速率是植物生理学中两个极为重要的指标。目前有关植物叶片光合速率和呼吸速率的测定方法，存在着种种的局限性，应用不很理想。pH 计法采用复合式电极以 pH 计测

定反应体系中的 pH 而推导出植物叶片光合作用或呼吸作用强度的大小，测试的灵敏度与 pH 计的精度密切相关。

三、制成酶 pH 计

酶大多是蛋白质，其作用如同生物催化剂催化复杂的化学反应。酶的专一性（或高选择性）及其对低浓度底物的催化能力，使之可固定在选择性电极上，制成可测定 pH 的 pH 传感器。酶的固定化是研制酶传感器的关键，由于酶的高选择性，使酶 pH 传感器的灵敏度相当高，其精确度达 0.02 个 pH 单位。

第五节　pH 计的发展趋势

pH 测量与现代工业、农业、医学、生物工程、环境及科学研究等领域息息相关。在 20 世纪 70 年代以前，pH 计主要采用各种玻璃电极、金属-氢电极、金属-金属氧化物电极等。随着现代科学技术的发展，尤其是在现代生命科学、环境科学和高科技领域的迅速发展，用传统的玻璃电极进行 pH 测量具有一定局限性，这是由于玻璃电极存在阻抗高、易破损、不能用于含 HF 溶液的 pH 测定，且在高碱度情况下存在“钠误差”等缺陷。同时由于其体积大，不适用于微区、微环境和生物活体的在线检测，难适应在恶劣环境下使用。因此，必须进行各种新的或特殊用途的 pH 计的研究、开发、应用及其机制的研究。

一、电脑式 pH 计

随着微电子技术的不断发展，智能校准型酸度计（即电脑式 pH 计）取代传统的手动调节型酸度计已成为必然趋势。这类设备仅用少数几个功能性按键对操作菜单的选择，即可以完成整个校准测量工作，大大方便了用户。智能型 pH 计的基本测量原理是将来自传感器电板的高阻电动势测量信号，经输入阻抗变换单元，变成低阻信号到A/D 转换后并将数据送到单片机，温度传感器或温度信号也经过 I/V、A/D 转换后并将数据送到单片机，经单片机数据处理后，由显示器显示数据。智能校准型酸度计的技术已经成熟，具有校准记忆、检测时间定时等功能，使 pH 计的使用更加方便灵活，准确可靠，重复性好，赢得广大用户的喜爱，逐渐会得到广泛的应用。

二、光导纤维 pH 计

光导纤维 pH 传感器是一种灵敏度高、可进行连续、自动测量的传感器，它区别于 pH 电极的电化学测量方法，利用光学性质进行 pH 测量，具有许多传统的 pH 计无法比拟的优点，已研制出用于 pH1.0～14.0 范围内不同区间 pH 测量的光极，测量 pH 变化的精度达到±0.001 个 pH 单位。特别适用于在线分析和生物医学领域，尤其是体内在线检测方面获得广泛应用。

三、化学修饰电极 pH 计

近年来电极的修饰物种类越来越多，开发了许多新型化学修饰 pH 传感器。像聚萘

酚类和聚氨基萘酚类修饰电极，可用于人体血清 pH 的检测。

四、酶 pH 计

酶 pH 传感器的灵敏度相当高，其精确度达0.02个 pH 单位。但由于酶的固定化技术的局限性及其活性问题，迄今酶 pH 传感器真正商品化的极少。

五、金属-金属氧化物 pH 计

金属-金属氧化物 pH 传感器优点在于易于制备，可用于高温、高压下测试，并向微型化方向发展。国内在金属-金属氧化物 pH 传感器的微型化发展上也取得了一些成绩：钨-氧化钨微电极已制作成功，已研制出的 pH 传感器将指示电极与甘汞电极配合使用可测定部分水果汁液的 pH，在 pH 2.5～10.0 的范围内效果较好。

随着科学技术的不断发展，将会产生越来越多的新型 pH 计，它们的功能各异，更加方便我们的使用。

主要参考文献

丁海铭. 2002. 实验室智能校准型酸度计的检测. 计量技术，(5)：38～40
黄晓东. 1995. 应用改进的甲醛法测定食品中的蛋白质. 山西食品工业，(4)：40～44
林荣镜，庄熙. 2003. 电脑式 pH（酸度）计电计的检测探讨与验证. 计量技术，(9)：42～44
林荣镜. 2001. pH 计的基本原理与特殊故障分析. 计量技术，(12)：57
凌恩伟，赵新华，谢继红. 2002. 如何正确使用 pH 计. 计量技术，(7)：54～55
牛晓岚，孙丽. 2003. 谈酸度计的检修. 大众标准化，(1)：37
彭红，朱兴喜，汤黎明. 2003. 酸度计计量检定中的常见问题及解决方法. 医学计量，(4)：30
王刚，万其进，叶永康. 1999. pH 化学传感器的进展. 分析科学学报，15 (3)：246～251
萧浪涛，彭克勤. 2002. 应用高精度 pH 计测定植物的光合速率和呼吸速率. 生命科学研究，6 (4)：25～28
薛云兵. 2001. 使用维护实验室用 pH 计的注意事项. 计量技术，(5)：62
周锦帆，黄伟. 2003. pH 测量原理及注意事项. 检验检疫科学，13 (1)：50～53
左华，张立桥. 2002. pH 计的应用与维护. 中国仪器仪表，(3)：46～48

第三十二章　紫外-可见分光光度计

紫外-可见分光光度分析方法日趋丰富和完善，已成为物质定性和定量分析中重要的手段之一。在分析化学、有机化学、药品分析、食品检验、医疗卫生、环境保护等方面得到了普遍应用，尤其是在生命科学各个领域和科研生产中更得到了极其广泛的应用。在生命科学突飞猛进的今天，它已被认为是生命科学的眼睛，生命科学仪器中的主干产品之一。

第一节　基本概念与基本原理

一、定性分析和定量分析的依据

分光光度法已成为物质定性和定量分析中不可缺少的手段之一，任何物质只要在紫外-可见波段中有吸收光谱，就可以用光谱光度分析方法来进行定性和定量分析。

当光穿过一种物质时，能量有可能几乎不损失，即物质不吸收光；能量也有可能损失，即物质吸收了光。后一种情况下，物质的分子或原子吸收特定波长的光，能量发生改变，从低能级的基态跃迁到较高能级的激发态。特定波长的光被吸收就产生了吸收光谱。物质分子吸收的能量越多，跃迁后激发态和基态的能量差就越大，产生的光谱的波长就越短。由于物质每个分子都有一系列严格的能级，不同的电子能级跃迁就会产生不同的谱带系，所以紫外-可见吸收光谱不是谱线或窄带，而是有一定宽度的谱系带组成的带状光谱。根据物质吸收光谱曲线的形状，吸收峰的数目，各吸收峰波长的位置和相应的摩尔吸收光系数等参数就可以对物质进行定性分析。其中，各参数中最大吸收峰波长以及相应的摩尔吸光系数的最大值是物质定性鉴定的最主要参数。

利用分光光度计进行定量分析的基本原理是朗伯-比尔（Lambert-Beer）定律。朗伯-比尔定律指出：当入射光强度 I_0 一定时，溶液的吸光度 A 与溶液的浓度 C 和光径（液层厚度）b 的乘积成正比。

$$A = \lg I_0/I_t = \lg 1/T = \varepsilon bC$$

式中：T 为透光度，通常以百分率来表示 $T\%$，ε 是常数，即消光系数。当 C 以mol/L，b 以 cm 表示时，则消光系数 ε 为摩尔吸光系数，常写成 $E^{1\,mol/L}_{1\,cm}$，单位为 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$。同一个化合物在不同的波长下具有不同的 ε 值，但在特定的波长下，它却是一个特征常数。因此，摩尔吸光系数值 ε 表明了物质对某一特定波长光的吸收能力。

如果一个样品有数种的吸收物质或一种溶液中同时含有 n 种吸光物质，且各组分之间无相互作用，则总的吸光度为各个吸收组分的吸光度之和。

就紫外-可见分光光度分析方法来讲，可以分为标准曲线法、浓度直读法、多组分

分析法、差示光度法、导数分析法、光度滴定法、双波长法和差光谱技术等。其中标准曲线法是最经典的方法，但目前大部分分光光度计已经能直接在仪器上读出样品的浓度，而不需要作标准曲线。多组分分析法通过解联立方程和 Fry 方法对多组分混合物进行分析。差示光度法分为高吸光度法、低吸光度法和最高精度法，这 3 种方法均有放大刻度标尺的作用，因而也被称为扩展量程光度法（expanded scale spectrophotometry）。现代的紫外-可见分光光度计都提供不同吸光度值的衰减片，以代替已知浓度的样品作为空白对照，使差示光度测定更加方便。光度滴定法通过检测溶质浓度的变化随吸光度变化可以指示滴定分析法的终点。

导数分光光度法对吸收光谱曲线进行一阶或高阶求导，即可得到各种导数光谱曲线。导数光谱能够分辨两个或两个以上完全重叠或以很小波长差相重叠的吸收峰。当一个弱峰处于强峰的吸光度急剧上升处时，用一般方法很难检出弱峰，而导数光谱可以提高分辨能力，一般经过数次求导后，有可能分辨出叠加在强峰肩部的弱峰。导数光谱还能够确认宽阔吸收带的最大吸收波长。

差光谱是利用分光光度法测定大分子溶液构象的重要手段之一。蛋白质的光吸收是由于芳香族氨基酸侧链，主要是酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸的光吸收所造成的结果。差光谱就是利用了环境对生物大分子生色基团的微扰作用，使其吸收峰值的位置、强度和谱带的半宽度发生变化。如利用溶剂、pH、温度、浓度等的微扰，使蛋白质分子的酪氨酸的吸收峰发生变化，从而推断这些生色基团在大分子中的状态是隐藏的、半暴露的还是暴露的。

二、影响定量分析的因素

虽然朗伯-比尔定律表明了吸光度与光径和浓度之间的线性关系。但只有在测试较稀浓度的溶液时它才成立，在实际测量中常观察到偏离直线的情况。这些偏离常常是由于一些物理的、化学的以及仪器的原因和人为因素造成的。物理和化学的原因如溶剂和溶液对光的反射有较大的差异，溶液浓度太大引起分子的结合；pH、互变异构、光分解、样品有荧光、样品混浊有散射、溶剂选择不当、温度和压力等对测量都有影响。仪器因素，如检测器、电位计、测量系统的非线性、杂散光的干扰、谱带半宽度太宽等都可能引起测量误差。

（一）谱带半宽度的影响

在朗伯-比尔定律的推导中，我们假设采用单色辐射，但实际上不可能得到某一特定波长的单色光。分光光度计的谱带或通过吸收池波长范围取决于仪器和分析的环境。如光源发射线光谱，则谱线虽细窄，但仍为具有一定宽度的谱带。紫外-可见分光光度法分析中，光源发射连续光谱，采用单色器来分离出所需要的单色光，单色光的纯度由狭缝的宽度来决定，但为了保证检测光的强度，狭缝必须要有足够的宽度。因此从单色器中出来的单色光通常是包含一定波长范围（λa 和 λb 之间）的谱带。这时测得的溶液的吸光度是波长 λa～λb 之间的某个数值，但并非 λa、λb 两点吸光度的平均值。实验证明在一定的光强下，谱带半宽度越小，所得的吸收光谱与实际越相符，标准曲线的直线

关系越好。虽然谱带宽度对测定是有影响的，但谱带无限小也是不现实的。由于分子吸收光谱通常是比较平坦的，随着仪器的发展，使用现代的分光光度计，在谱带较宽的吸收带的最大值处测量时，这种由谱带宽度带来的误差一般是可以忽略的。但当吸收带比较窄且陡时，则必须谨慎考虑谱带半宽度的影响。

（二）杂散光的影响

理想的单色器只从出射狭缝中透射出所需波长的谱带，但实际上常常还有杂散光（stray light）从出射狭缝中射出来。当样品的透光度比较大时，杂散光的影响相对比较小。但当测量高吸收的样品时，杂散光的影响不能不考虑，尤其是在接近紫外极限时，因为在短波长时光源强度和检测器的灵敏度均减弱，杂散光可能变成入射光的一个比较大的干扰分数。因此，许多分光光度计的生产厂家都在采用一系列最新技术来降低仪器的杂散光。

（三）光度准确度对浓度测定的影响

所谓光度准确度（photometric accuracy，PA）是指实际测量的光度读数值与真实值之差。吸光度（透光度）读数的误差所引起的浓度测定的误差还决定于浓度。被测溶液过浓、吸光度过大或溶液过稀、吸光度过小时，测定的准确度均较差。

（四）仪器稳定性对测定的影响

仪器的稳定性是指仪器的噪声（noise）和漂移（drift）的综合。光谱仪器不稳定绝大多数原因是由于电源的不稳定所引起的。除了电源的影响外，其他电子部分如放大器、光学传感器的供电电源及试样化学反应的变化等化学因素也可以对检测结果产生不稳定的影响。

（五）线性及线性动态范围的影响

紫外-可见分光光度计的线性是指实验点接近或偏离朗伯-比尔定律直线部分的程度。如果给定物质的两个浓度的响应值之差正比于两个被测试样的浓度差，则仪器是线性的。

第二节　紫外-可见分光光度计

一、种　　类

目前分光光度计按光学系统可分为单光束、双光束和双光束/双波长 3 种类型。

（一）单光束分光光度计

单光束分光光度计是光路设计最简单的一种分光光度计。它只有一条光路，轮流通过参比溶液和试样溶液进行光强度的测量。但单光束仪器测量结果受电源的波动影响较大，

容易给定量结果带来较大的误差，因此要求光源和检测系统有很高的稳定性。此外，单光束仪器特别适用于一个波长处作吸收测量的定量分析。其光路图如图 32-1 所示。

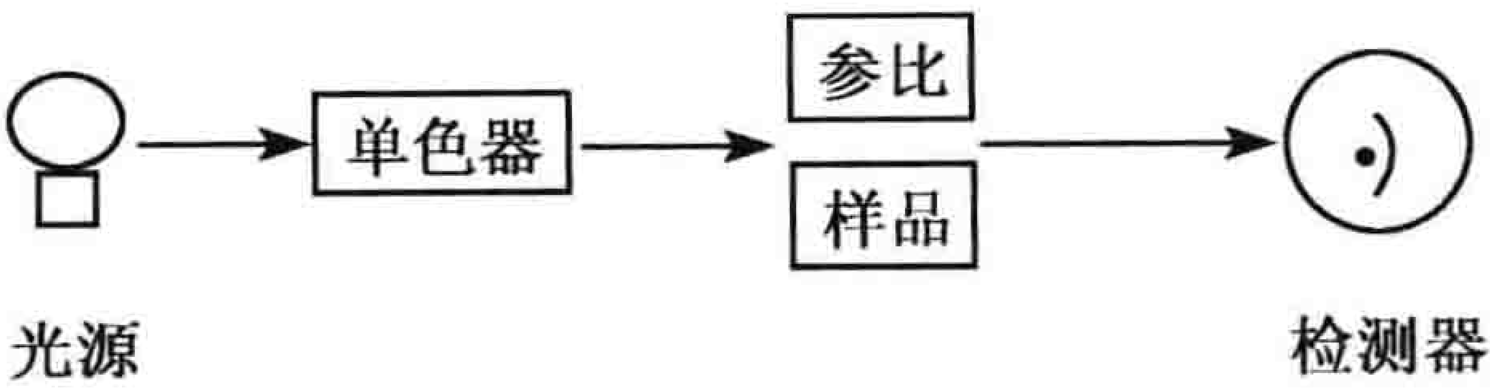


图 32-1　单光束分光光度计光路示意图

（二）双光束分光光度计

目前，许多现代的分光光度计都是双光束型，由于样品溶液和空白溶液的对比是同时或几乎同时进行，光源和检测系统的漂移可以得到一些补偿，还可以添加很多附件，从而大大扩展了它的使用范围。

双光束分光光度计的光路设计基本上与单光束相似。差别只在单色器的出射狭缝和样品室之间加了一个斩波器。它的作用是以一定频率把一个光束交替分成两路，使一路通过参比溶液，另一路通过样品溶液。然后由检测器交替接收（时间式测量系统）或两个匹配的检测器分别接收（空间式检测系统）参比信号和样品信号。接收的光信号转变成电信号后，由前置放大器放大，并进一步解调、放大、补偿等，最后由显示系统显示这两种信号的比。其光路图如图 32-2 所示。

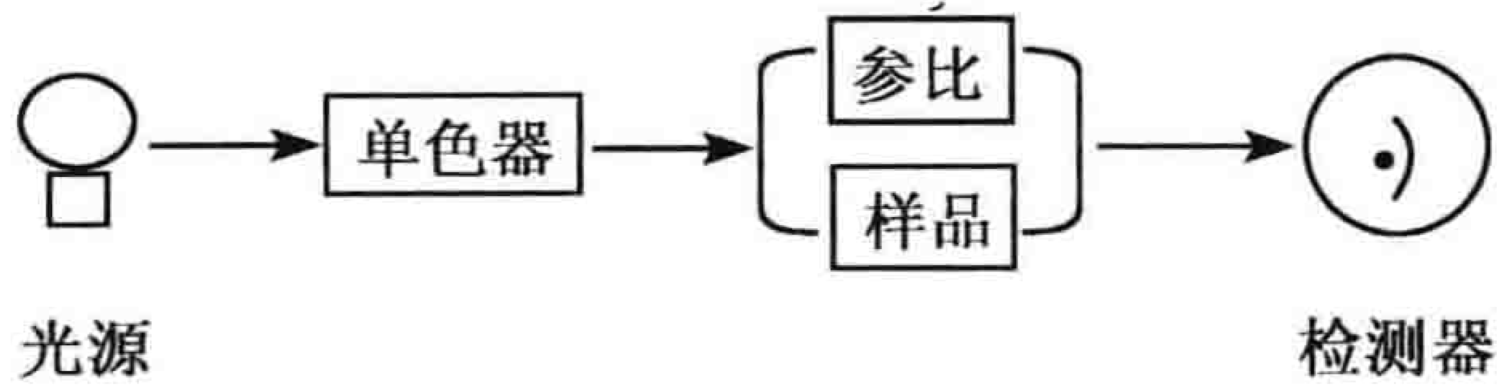


图 32-2　双光束分光光度计光路示意图

为了保持参比光路在不同的波长有恒定的光电流输出，双光束分光光度计通常有两种设计形式：一种是过去常采用的形式，即光电倍增管电压恒定，但狭缝亮度随波长而变化；另一种是现在采用的形式，即狭缝宽度恒定，光电倍增管电压随波长而变化。后者的优点在于在测量时可以保持恒定的狭缝宽度（谱带半宽度），这对于保证一些数据在相同的测定条件下进行比较是有利的，对于一些需要用高吸收样品作参比溶液的测定，采用差示光度和差光谱则更为合适。

（三）双波长/双光束分光光度计

双波长/双光束分光光度计既能以双光束方式又能以双波长方式测量，既能扫描样品的吸收或透射光谱，又能记录样品反应的动力学过程。双波长方式不仅能测高浓度试样、多组分混合试样，而且测定混浊样品时比单波长测定更灵敏更有选择性。双波长测定时，两个波长的光通过同一吸收池，可以消除因吸收池的参数不同、位置不同、污垢以及制备参比溶液等带来的误差，从而可以显著地提高测定的准确度。另外，双波长方式是用同一光源得到的两束单色光，故可以减小因光源电压变化产生的影响，可得到高灵敏和低噪声的信号。双波长光路示意图如图 32-3 所示。

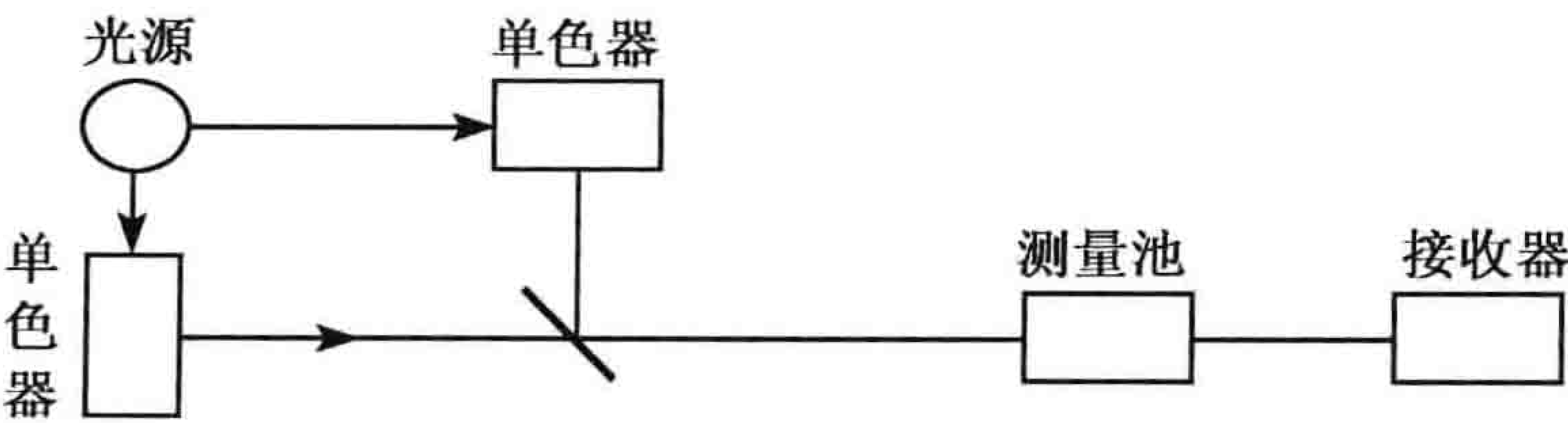


图 32-3　双波长分光光度计光路示意图

二、组成与结构

分光光度计因使用的波长范围不同而分为紫外光区、可见光区、红外光区以及万用（全波段）分光光度计等。仪器的整机结构分为主机和光源（包括稳压和稳流电源组件），而主机又分光学系统及光电转换、放大、模/数转换、计算机电路、打印电路和稳压电源等电子线路部分。

紫外-可见分光光度计的工作原理如下：从光源发出连续辐射光，经入射狭缝到单色器后，按波长大小色散成单色谱带。从出射狭缝射出的单色光，通过比色皿照射到光电管上。光电管输出的光电流经过微电流放大器后，以模拟量（与光电流成比例的电压值）形式输入模/数转换器。此时，模拟量被转换成数字量，该数字量由微处理机做相应处理后，就能根据操作者指令，自动完成各种功能。紫外-可见分光光度计结构如图32-4所示。



图 32-4 紫外-可见分光光度计结构示意图

（一）光源

紫外-可见分光光度计的理想光源，应能够提供在整个紫外-可见光域连续的辐射，强度高，能量随波长变化不大，具有良好的稳定性，特别是对于单光束仪器。这种理想光源实际上是难于实现的。仪器使用的光源主要有连续光源和线状光源两类。连续光源主要有钨（卤）灯、氢灯、氘灯、氙灯等，线状光源包括汞灯、激光光源、无电极放电灯等。

钨灯是可见和近红外区最常见的连续光源，波长范围约为320～3200nm。钨灯的光谱分布与灯丝的工作温度有关，随着温度的升高，总辐射量增加，光谱向长波方向移动，但灯丝寿命减短。在钨灯中加入适量卤素化卤化物可制成卤钨灯（碘钨灯、溴钨灯等），并且用石英或高硅氧玻璃制作灯泡，可增大发光强度，延长使用寿命和避免灯泡发黑，节省能量。紫外范围的光源早期常用氢灯，现在则使用氘灯。氘灯的波长范围约在180～360nm，其发射强度和灯的寿命方面都比氢灯要高2～3倍。目前主要的仪器生产公司一般使用卤钨灯和氘灯作为紫外-可见分光光度计的光源，仪器一般能自动寻找紫外、可见光源最佳切换点，使氘灯和卤钨灯能量互补，延长灯源的使用寿命，保证测试质量。氙灯是既辐射紫外又辐射可见波长的光源，可使用的波长范围在180～1000nm（无臭氧氙灯约250～1000nm），辐射强度大，常用作荧光分光光度计的激发光源。在紫外-可见分光光度计中只作为研究光化学反应和快速动力学反应的激发光源。

结构简单的紫外检测仪中常用无电极放电灯作为光源。无电极放电灯虽然只消耗很少的能量（如LKB公司紫外检测器上的灯只有3W），但在紫外-可见范围有很大的能量输出，而且功率低、产热少，有利于保持样品室温度的恒定。这种灯的寿命可长达6000h。激光光源与普通光源相比单色性好，谱线强度大，方向性好，相干性强。其中

氩离子激光器和可调谐染料激光器已经应用于紫外-可见检测中。

（二）单色器

单色器是一种用来把来自光源的混合光分解为单色光并能随意改变波长的光学装置，它是紫外-可见分光光度计的心脏部分。单色器是一个完整的色散系统，除了色散元件外（棱镜和光栅），还有入射和出射狭缝以及一组反射镜。

1. 棱镜

当含有不同波长的混合光通过棱镜时，由于各种波长的光在棱镜内的折射率不同，光因而被分开，此种现象称为棱镜的色散作用。可见光范围常采用玻璃棱镜，色散力强、廉价。紫外范围常用的材料是硅、矾土和人造蓝宝石（波长范围 200～4000nm）。矾土和人造蓝宝石价格昂贵，所以常用熔融石英作为棱镜材料，石英棱镜工作波长范围为 185～4000nm，在紫外区有较好的分辨力而且也适用于可见光区和近红外区。棱镜单色器的特点是波长越短色散程度越好，越向长波一侧越差。所以用棱镜的分光光度计，其波长刻度在紫外区可达到 0.2nm，而在长波段只能达到 5nm。

棱镜单色器的光谱纯度主要决定于棱镜的色散特性和光学设计。通常使用本生（Bunsen）和利特罗（Littrow）两种玻璃单色器。

2. 光栅

光栅是分光光度计中最为重要的部件，它直接决定着仪器的分辨率。光栅作为色散元件具有许多独特的特点，如波长范围较宽、色散近乎线性等。光栅分为透射光栅和反射光栅两种，常用的绝大部分为反射光栅。透射光栅是在一块玻璃上或其他透明材料上刻上一系列平行的紧紧相靠的凹槽，生产这样的母光栅需要精密的装置，比较昂贵。复制光栅比较便宜，虽在性能上次于母光栅，但能满足应用。反射光栅是在复制光栅的表面上喷涂铝的薄膜制成的，也可在抛光的玻璃表面或金属表面镀铝，然后在铝表面上刻大量的平行线制成。光栅的刻线越多，分辨率就越高，每单位长度的刻线越多，它的色散就越大。闪耀波长是光栅的另一个重要参数，在闪耀波长处，光栅有最大的能量输出。光栅的主要缺点是有次级光谱干扰分析，棱镜的主要缺点是色散波长呈非线性分布。

光栅单色器有几种排列方式，一种是利特罗式，另一种是埃伯特（Ebert）式。由采尼（Czerny）和脱纳（Turner）加以改进后为现代仪器所常采用。

从光栅的刻制方法看，它可分为机刻光栅和全息光栅。机刻成本极高，生产周期长，不仅数量上远远不能满足对光栅日益增长的需求，而且极其昂贵，因而通常采用复制光栅。光栅复制过程中，硅油厚度、真空度和铝层厚度都会影响光栅质量。机刻光栅虽有鬼线和伴线，但由于使用了激光干涉仪光电控制装置，性能大大提高。机刻光栅的光能量损失小，线性范围广，寿命长，是较为理想的光栅。现在大部分分光光度计的单色器都用全息光栅来代替刻制光栅。全息光栅的制造基于双光束干涉原理，不需要刻划机，不存在刻刀磨损的影响，它记录的是干涉条纹，不存在周期误差，所以它无鬼线，

杂散光也低。全息光栅所使用的波段较窄，并聚焦在非圆曲线上，凹面全息光栅既可以记录平面波，也可以记录球面波，特制的凹面全息光栅还具有消相差的特性。此外全息光栅由于刻槽呈正弦形，因此它无明显的闪耀方向。全息光栅的制造周期短，一般说曝光时间不到1h，因此全息光栅被大多数公司所采用。但是，全息光栅的制造需要注意：激光器的选择、感光材料的选择、毛坯选择、光致抗蚀性的选择、曝光时间以及槽形控制等问题，这些都直接关系着光栅的质量。

3. 双单色器

一些高级的紫外-可见分光光度计常采用双单色器，即在一个单色器中使用两个色散元件，进行二次分光，这样可以大大提高仪器的分辨率，减少杂散光，从而提高仪器的性能。双单色器有棱镜-光栅单色器和光栅-光栅单色器。如Perkin Elemer公司生产的Lambda 900紫外-可见近红外分光光度计采用双单色光学系统，在370nm处的杂散光仅为0.000 08%T，基本彻底消除了杂散光，如图32-5所示。

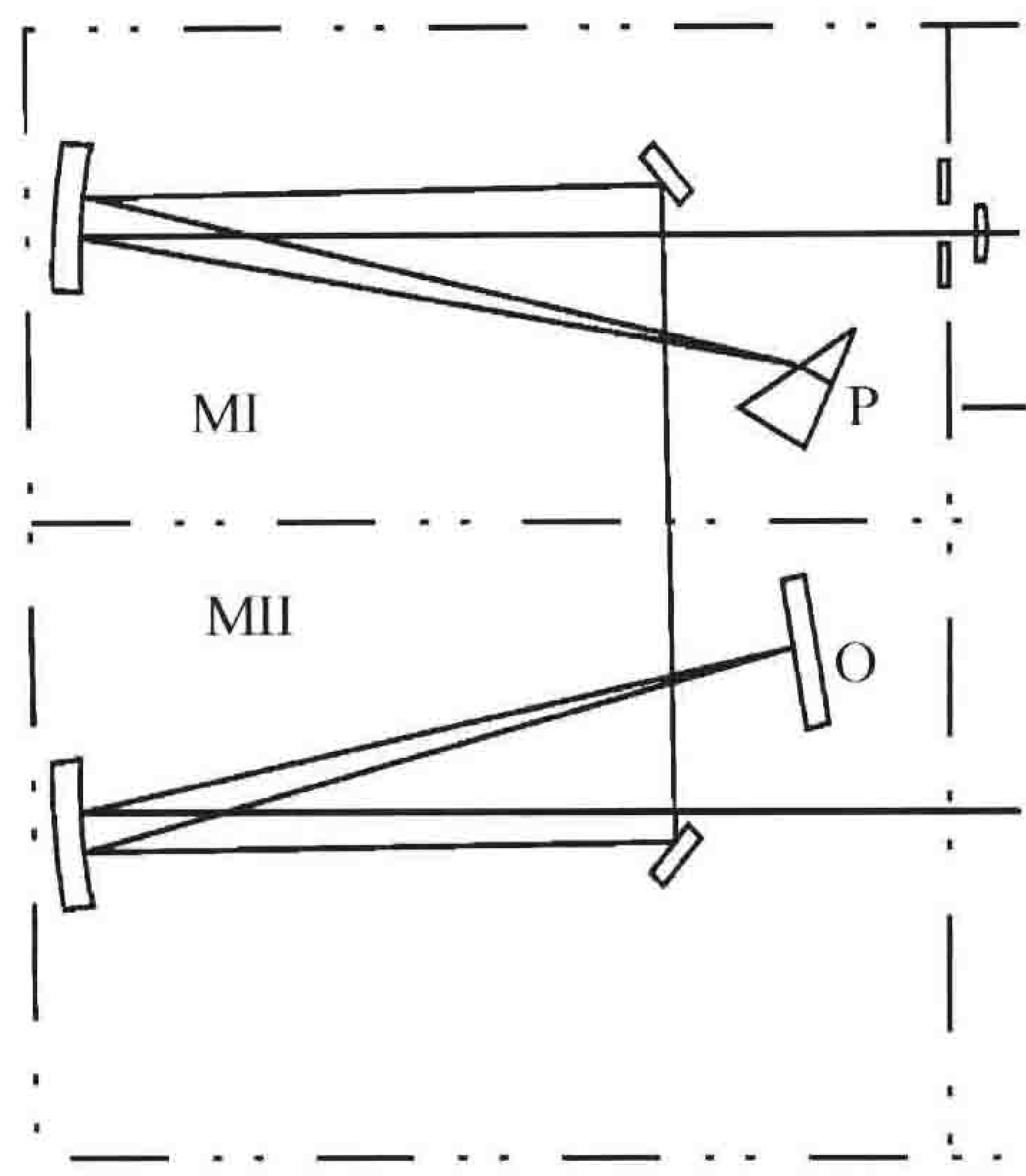


图 32-5 双单色器

M Ⅰ和 M Ⅱ分别为第一和第二单色器，P为棱镜，O为光栅

4. 入射狭缝和出射狭缝

狭缝是单色器的重要组成部分，直接关系到单色器的分辨率的优劣。狭缝过大，谱带单色性差，会影响定性测定的分辨率和定量测定的线性关系。狭缝过窄，单色性虽然好，但光通量大大减弱，降低了信噪比，同样影响测量精度。狭缝的宽度现通常用从单色器出来的有效宽度来表示，单位为纳米。

光栅单色器的狭缝宽度固定时，在不同波长的谱带宽度是固定的。由于棱镜的色散是非线性的，为了得到恒定的有效带宽，在长波区需使用窄的狭缝，而短波区则使用宽狭缝。

（三）样品室

样品室内有吸收池及相应的附件，如恒温附件、低温附件、反射附件等。吸收池按材料主要分为石英池和玻璃池，按形状又可分为长型池、流动池、微型池等。紫外波段的材料一定要用石英池，而可见区则可采用玻璃池或一次性使用的塑料池。

（四）检测器

检测器是紫外-可见分光光度计另一重要组成部分，可将光信号转化成可输出的电信号。目前常用的检测器是各种光敏元件，主要有光电池、光电管、光电倍增管、半导体光电二极管和二极管阵列检测器。二极管阵列检测器可以检测出波长-时间-吸光度的三维立体图。

光电池是早期比色计和光度计的检测器，光电管是由密封在抽真空的玻璃或石英罩

内的两个金属电极组成的，常用的光电管有“蓝敏”和“红敏”两种。前者系在镍阴极表西上沉积锑和铯，可用波长范围为 210～625nm，后者系在阴极表面上沉积银和氧化铯，可用波长范围为 625～1000nm。

上述两种检测器现在已被灵敏度大、光谱响应范围宽的光电倍增管代替。它实际上是配有两次发射电极的光电管，这些两次发射电极使得光电流得到放大。选择光电倍增管有 3 个重要的指标：波长响应范围、灵敏度和噪音水平。现在大多数紫外-可见分光光度计已采用端窗光电倍增管代替侧窗光电倍增管。因为端窗型的管子机械位置好，光束容易聚焦在阴极上，阴极面积大且容易被冷却，最重要的优点是它有较高的量子效率和增益。这些优点对混浊样品的测量是极为有利的。

光电二极管矩阵（photo diode array，PDA）作为紫外-可见分光光度计的多道检测器是近些年来发展起来的新技术。PDA 是由很多光电二极管组成的，它们同时分别接收一定波长间隔的光信号，其响应时间是可变的，可为百分之几秒。光电二极管的数目决定仪器的分辨率，二极管数目越多，则仪器分辨率越高。目前的大多数生化分析仪的二极管矩阵都有 7～10 个光电二极管，包含了从 340～700nm 范围内常用的 7～10 个测定波长，有的分析仪甚至多达 16 个波长。

检测器产生的光电信号一般比较弱，需要经过放大器放大后再输入计算机，分析处理、存储，然后送入输出装置，显示结果。

三、有关附件的作用及其配置

分光光度计配上不同的附件以后可以扩大仪器的使用范围，极大地简化了操作的过程，提高工作效率，解决许多工作中的具体需要。不同型号的仪器可选配不同的附件，附件种类很多，如用于自动流动注射分析、色度测定、多组分分析等的各种软件包，及其相应的专用系统。丰富的通用软件包，不仅扩展了用户的用途，而且可以为从生命科学到太阳能利用等各个领域的分析，提供所需要的软件工具。

（一）吸收池

吸收池有长光径吸收池、短光径吸收池、密封池、微量池、流动池和漏斗池附件等。长光径吸收池用于测量浓度低，样品量多的溶液，有矩形和圆柱形（有的为可拆卸的）两种。光径长一般分为 20nm、50nm 和 100nm 3 种。短光径吸收池适用于浓度高，样品量少的溶液，特别适用于低温分析。常用的光径长度为 1nm、2nm 和 5nm。带盖的密封池适用于挥发性样品的测定和升温测定。微量池有各种光径和各种容量要求，它对于浓度不高、样品量又少的测定是最理想的，例如，两侧池壁是透明的，要求仪器光束聚焦好，池架位置要正确，避免光束打到池壁上而引起测定错误；两侧池壁是发黑的，可避免光束穿过池壁产生的测定错误或池壁反射带来的误差。流动池的容量、形状各异。用此附件测量柱层析的洗脱液的吸光度可以节省大量人力，如果仪器作为高压液相色谱的检测器，就更需用此附件。

漏斗池附件包括一个漏斗池和一个真空废液容器，对于快速程序分析大量相似的样品是很理想的。根据样品量和浓度可以选择不同的光径使用。Perkin-Elmer 公司 550 系

列和 Lambda3、5 型均有此种附件。

以上所述各种吸收池的材料均分石英和玻璃两类（每类中又有不同等级）（图 32-6）。

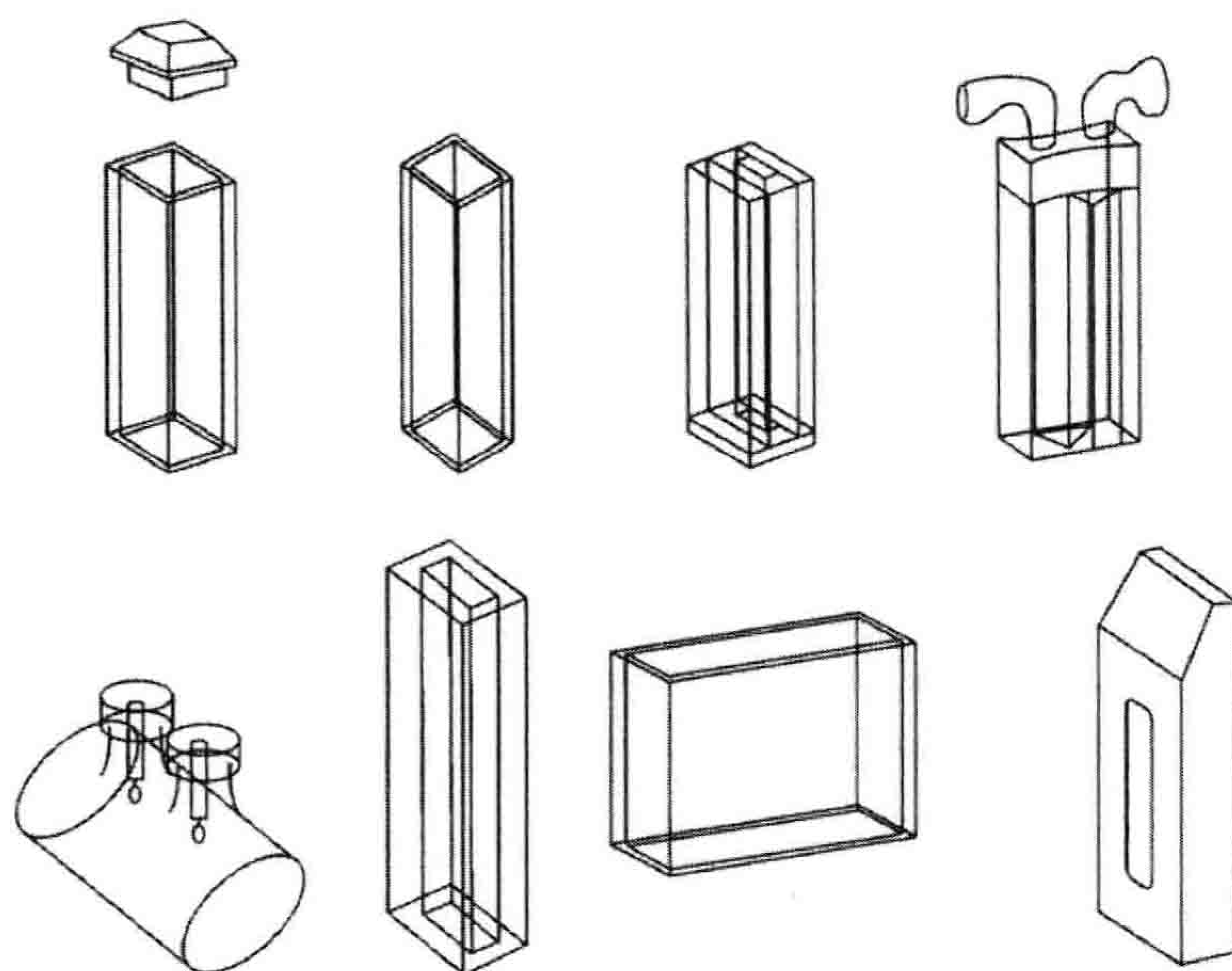


图 32-6 各种类型的吸收池

第一排从左到右依次为①常规正方形池，②密封池，③微量池，④流动池

第二排从左到右⑤圆柱形长吸收池，⑥矩形短光径池，⑦矩形长吸收池，⑧吸收池隔片

（二）自动加样附件

自动加样附件对于任务繁重的医院化验室和大量相同试样的工厂车间是十分重要的，但对于样品多变，测量准确度要求很高的科研单位并不适合。

（三）恒温附件

恒温附件一般可恒温到 50℃左右。如果需要更高的温度，如做生物大分子的热变性曲线测定，则必须采用电恒温附件。恒温附件可以随时检测吸收池中的溶液温度。使用此附件时，样品室前后应有恒温隔板，防止温度影响光、电元件的正常工作。同时，作升温测量时应使用密封池，防止样品的蒸发引起浓度的改变。

（四）低温附件

低温时样品吸收大大增加，峰形变窄，因此对一些微量成分的分析非常有利。由于低温时样品吸收可为常温时的 10～30 倍，所以常采用短光径池（1mm）。低温附件是用一个杜瓦瓶，在杜瓦瓶中充以液氮，将样品池放在其中。在瓶上设有窗口，以使光束可以通过低温样品进行测量。如果杜瓦瓶质量好，窗上不会结霜，否则测量过程中结霜会给测量带来困难。岛津公司的 UV-3000 型配有低温附件。

（五）固体样品架

用于固体样品，如滤光片、胶膜的测定用架。

（六）薄板层析和凝胶电泳扫描附件

随着薄板层析和凝胶电泳技术的发展，需要相应的定量测定。这是在样品室中放置一个用马达自动移动层析板或凝胶板、柱的台架，使光束通过斑点或凝胶带，从而测出其吸光度值。几乎所有的双光束分光光度计均有此附件，用于薄板层析和凝胶扫描专用仪器的种类也不少。

（七）自动化学附件

自动化学附件可对大量样品进行稀释，加反应试剂，混合保温然后自动把溶液转移到分光光度计中进行测定。Pye-Unicam 公司的一种自动化学附件，对于大量样品需要进行化学处理后再进行测定非常理想。

（八）快速混合附件

快速混合附件用于快速混合两种样品，并在混合池中监测反应过程。岛津 UV-3000 型配有此附件。由于它在双波长法测定中使用，有些混浊样品，如线粒体中细胞色素 c 的反应过程，可不受共存成分的影响而被检测。

（九）进样器附件

进样器附件有微量进样器、电热恒温吸样器和自动进样器等。微量进样器可以对合成的 DNA 和蛋白质分子进行精确的测量，聚集后的参比光束和样品光束可以对 50μl 微量池中的 DNA 进行扫描。电热恒温吸样器的设计如吸样器，但包括了准确温度控制，采用电热控温的方式。

（十）积分球

积分球是一种收集反射光的装置，通常是在积分球的表面涂上具有高漫散射能力的材料硫酸钡，用来使样品表面反射出来的能量均匀化。可用于测量混浊样品的吸光度和固体样品的表面反射。

（十一）端视光电倍增管

有效地测量混浊样品的散射，能简便地测量如线粒体和不溶聚合物等悬浮试样等散射光光谱特征。

（十二）镜面反射附件

利用试样的镜面反射，测量与标准反射板的相对反射率，用于测量膜厚度和反射特性。

（十三）遥控测量附件

使用光纤将光程导向外部试样室，可在辐射环境下或生物流体试样室中进行测量。

(十四) 软件附件

酶动力学附件用于观察酶或其他反应系统随时间的变化，从而计算酶动力学或反应动力学的参数，目前一般的公司都有此附件。多组分分析附件在样品不进行分离提纯的情况下，可同时分析样品中多种成分的含量，一般利用计算机软件进行计算。

四、几种紫外-可见分光光度计性能的评价

紫外-可见分光光度计的制造厂家很多，各公司的产品各有特色，现总结几种主要厂家生产的仪器的主要特点。

美国 Perkin Elmer 公司生产的紫外-可见分光光度计主要用于分析、生化和环保等领域，有 Lambda10/Bio 系列、Lambda20/Bio 系列、Lambda18 等，其中 Lambda18 为最高型号。Bio 系列属生化系列，仪器配有独特的实验室信息管理系统软件，可进行浓度测定、酶活力测定、纯度测定、常规紫外-可见分光光度分析。有 5 种预设方法供选择：核酸分析、蛋白质分析、动力学分析、一般定量分析和常规紫外-可见分光光度分析法。此外还具有用于仪器校准的 VALItrans 方法软件，用于 DNA、蛋白质和酶动力学分析的 BIOtrans 方法软件，用于水质、环保分析的 SPECTROtrans 方法软件等多种专业分析软件。

日本日立公司（HITACHI）生产的紫外-可见分光光度计有 U-100、U-1500、U-2001 和 U-3000 系列等，其中 U-3000 性能最好。该公司产品一般采用濑谷-波冈式光路设计，在光栅的研制方面历史悠久，实力雄厚，仪器综合指标较好。日立公司的紫外-可见分光光度计的软件从光度计控制，测量条件的设定和管理，实现测量、记录和显示数据以及应用等方面来看，性能优越，操作极其方便，并且有丰富的数据处理功能。在生物化学领域尤其是分子生物学方面，对于 DNA 和蛋白质也有较全面和可靠的分析功能，核酸分析软件包包含了大部分最新测试技术。此外，软件中还有单波长、双波长和三波长计算功能。定量分析中，有一级校准曲线、二级校准曲线、三级校准曲线和 SEGMENT 校准曲线 4 种类型的校准曲线。

美国瓦里安（VARIAN）公司的紫外-可见分光光度计产品有 Cary50、Cary100、Cary300、Cary400 等。Cary400 谱带宽度 0.01nm，步进马达驱动连续可调。采用的双单色器，与常规的双单色器相比，杂散光和噪音极低。此种光栅大多用在紫外-可见-近红外分光光度计中，如日立公司的 U-3501 和 U-4001 以及瓦里安公司的 Cary500。瓦里安公司的 Cary400 是目前紫外-可见分光光度计中各项性能指标最好的型号，并具有多种蛋白质和核酸分析功能，可研究 DNA 的热变性和复性等特征。

惠普公司是集仪器、电脑和打印机一体化生产的公司，因此在紫外-可见分光光度计软件开发方面很有特色，如 HP8450 配有二极管阵列检测器，工作站可提供 17 种光谱处理数学方法。HP 公司开发了中文工作站，操作十分简便。

UNICAM 公司的产品系列有 UV2 系列、UV3 系列、UV4 系列、UV300、UV500、UV5500 系列，其中 UV4 系列最优，所有产品都使用全息母光栅和石英镀膜光学器件，保证了分析工作中较宽的线性范围。

美国贝克曼公司（BECKMAN）生产的紫外-可见分光光度计有 DU600 和 DU7000 系列。DU600 是内置微机的常规型分光光度计，DU7000 系列是由微机控制的具有二极管矩阵检测器的型号，波长范围在 190～1100nm，可实现超高速的全波长扫描，提供快速的光谱分析，特别适用于酶动力学研究和新方法的开发。DU 系列提供了丰富的生物学软件，包括蛋白质测定软件、核酸测定软件、DNA/Oligo Quant Analysis 软件、酶机制研究软件、单组分定量分析软件、多组分定量分析软件、酶活力软件、凝胶扫描软件、仪器性能测试软件等。

日本岛津公司（SHIMADZU）生产的紫外-可见分光光度计有 UV-1601、UV-1601PC、UV-2401PC 和 UV-2501PC 型等，该公司的产品着重于化学方面的研究，软件在数据处理方面很完善。

紫外-可见分光光度计的重要性能指标有：波长范围、波长准确度、波长重复性、杂散光、光度准确性、重复测量精确度、基线稳定性和平坦性、狭缝宽度、响应时间及扫描速度等。目前生产的紫外-可见分光光度计从覆盖的最低波长来看，瓦里安公司的 Cary400 最低波长可达到 175nm，波长准确度可以达到±0.1nm，杂散光可低于 0.000 08%T,光度准确性可达到±0.002nm（0.5Abs）、±0.003nm（1Abs）。双光束分光光度计在扫描 100%T 或 0A 线时（样品室中不放任何东西），基线的稳定性会影响光度准确度。Perkin Elmer 公司 Lamda18 可以达到±0.000 2A/h。狭缝宽度应允许有较多的光能量通过，以得到较高信噪比。但过宽的狭缝会降低光度的准确度和光谱细节的分辨率，甚至使带加宽。谱带半宽度每增加 10nm，基线吸光度值几乎增加 0.1，光谱细节的分辨率大大降低，但过窄可能会增加噪音。当能量高时，噪音的影响不明显；但当能量低时，如遇到高吸收样品时，噪音就明显影响光谱的平滑了。因此狭缝宽度可调最好，目前生产的仪器有连续可调和多挡供选两种类型，如 Perkin Elmer 公司的 Lamda18 为 0.5～4.0nm 连续可调；瓦里安公司的 Cary400 为 0.01～5nm 每步驱动 0.01nm 连续可调；HP 公司、岛津公司和 UNICAM 公司都有 6 挡可选的型号。响应时间的选择取决于样品的性质、所选择的狭缝宽度和信噪比。高吸收样品应选择长的响应时间以减小噪音。但在扫描光谱时，特别在快的扫描速度下，应选用快的响应时间以避免光谱的失真，除非噪音成为问题时，方可增加响应时间，因此仪器的响应速度应可调。现在生产的紫外-可见分光光度计有些可以调节响应时间，如日立公司的 HI3000 有快、中、慢三种响应模式，PE 公司生产的 Lamda18 和岛津公司生产的 UV-2501 则自动设置响应速度。扫描速度的选择取决于对不同性质样品所选择的谱带宽度和响应时间。一般对窄的吸收光谱，应选择慢的扫描速度，以及与噪音协调的快的响应时间。而对宽的吸收光谱，可以采用较快的扫描速度。从仪器的角度来考虑，当然扫描速度越快越好，扫描速度控制的精度越高越好。PE 公司生产的 Lamda18 可达 2880nm/min，日立公司的 HI3000 为 0.3、3、15、30、60、120、300、600、1200、1800nm/min 10 挡准确控制。惠普公司的 HP8450 和 BMDU7000 为二极管阵列检测器，全波段扫描时间为 0.1s，可以观察波长-时间-吸光度的三维立体图。目前紫外-可见分光光度计中有的使用凹面衍射光栅（如日立公司），有的使用全息光栅（如岛津公司），有的使用 Littrow 单色器（如瓦里安公司），有的使用全息

母光栅（如 UNICAM 公司）。依据光栅的性能和制造光栅的能力来看，日本日立公司实力较为雄厚，制造的光栅普及全世界；日立公司和法国米尔顿公司是世界上唯一两家制作机刻光栅的公司。

第三节 使用方法

以美国贝克曼公司生产的紫外-可见分光光度计 DU6400 进行核酸测定为例，介绍紫外-可见分光光度计的使用方法。

核酸测定模式下测定蛋白质和核酸样品方法简单、重复性高。利用 5 种程序可分别获得没有校正背景的情况下，280nm 处吸收值与 260nm 处吸收值的比率；320nm 波长下校正完混浊造成散射的背景后的 260nm 处吸收值与 280nm 处吸收值的比率；在 320nm 处校正背景后得到的 230nm 处吸收值与 260nm 处吸收值的比率；然后利用 Warburg 和 Christian 公式来测定蛋白质和核酸的浓度。用户可使用比率计算法选择合适的波长和因子来计算 DNA、RNA 或寡聚物的浓度。

具体操作步骤如下：

1）打开电源开关，运行仪器的自动诊断测试。

2）诊断完成后点击“Quit”进入主窗口。

3）在主窗口的应用项目框中选择测试项目，以“NUCLEIC ACID（核酸）”为例，进入核酸测定模式。

4）选择一个预置方法。该方法的参数必须与上文所述的 B：\NUCACID1、B：\NUCACID2 和 B：\NUCACID3 其中之一一致。在进行公式和波长选择后，点击“VIEW”即可进行计算。

5）确认紫外光源已经打开，点击“BLANK”将仪器在空气中调空白。

6）用 Filter Kit 中提供的半透明纸滤膜（filter # 215）作为样品，点击“Read Samples”进行读数。

7）屏幕上会显示数据，这些数据分别存储于 B：\NUCACID1、B：\NUCACID2 和 B：\NUCACID3 中。

8）如需要点击打印。

9）如果不保存此次测试结果，点击清除保存“Save Clear”；若需要保存测试结果，输入文件名点击“OK”即可。

10）点击“Quit”退回到主窗口。

11）对于其他方法，重复以上步骤即可获得所需数据。

第四节 在生物学领域中的应用

紫外可见分光光度计主要用于物质的定量测定。目前在定性分析方面紫外可见光谱可用于研究大多数生物配体与金属离子的相互作用，确定金属蛋白和金属酶中金属离子

配位环境的几何构型，追踪金属酶的催化机制以及酶活性中心的稳定性、金属离子的氧化态形式。由于研究内容涉及面很广，在实际应用中通常需要和其他研究方法（如荧光光谱、扩展 X 射线吸收精细结构谱、旋光光谱核磁圆二色谱）配合使用。

一、对蛋白质和核酸进行定量测定

（一）纯度测定

蛋白质在 280nm 处具有最大吸收峰，核酸的最大吸收峰在 260nm 处，因此对于核酸和蛋白质的混合物，可在它们在紫外光区的特征吸收峰处测出各自的吸光值。然后通过求出二者吸光值的比值来判断其纯度。纯核酸的吸光值的比值为 $A_{280}/A_{260}=0.5$；纯蛋白质吸光值的比值为 $A_{280}/A_{260}=1.8$。利用 A_{280}/A_{260} 的比值可以初步确定蛋白质和核酸的纯度。

（二）定量测定

根据朗伯-比尔定律对在紫外可见区内可以直接或间接发生光吸收的生物大分子利用消光系数进行定量测定，但这种方法的准确性随待测蛋白质纯度的提高而提高。F 因子法是根据蛋白质在 280nm 和 260nm 吸光度的强弱与浓度成正比来进行测量，这种方法适用于大多数蛋白质，但测量精确度较差，一般适用于溶液中的总蛋白质测定或半定量分析。

核糖核酸被核糖核酸酶水解后，吸光度约比原来增加 1/3。脱氧核糖核酸被脱氧核糖核糖酶水解后，吸光度也有所增加。用此法可以测定 DNA 和 RNA 混合物中 DNA 和 RNA 的含量。先在中性缓冲液中测定混合物的总吸收，然后加入核糖核酸酶，使 RNA 完全水解，测定水解液的吸光度。增加的值乘 3 为混合物中 RNA 的吸光度。然后再加入脱氧核糖核酸酶，使 DNA 完全水解，测定吸光度。增加的值乘 3 为 DNA 的吸光度。在 260nm 处，光径 10mm 条件下，吸光度为 1.0，相当于每毫升约有 45μl 的 DNA 或 RNA。

二、紫外可见光谱的定性分析在生物系统中的应用

（一）研究生物大分子的构象和构型

差光谱和导数光谱都可以用来研究生物大分子溶液构象，这些方法比 X 射线衍射分析方法简单，而且结合荧光探针法、圆二色和激光拉曼光谱、顺磁和核磁共振等方法可以研究生物大分子在特定生理状态下结构和功能的关系。

牛血清白蛋白（BSA）水溶液在 276nm 和 193nm 处有两个吸收峰。前者主要是蛋白质中酪氨酸、色氨酸的光吸收峰，后者主要是由肽基团的吸收而产生的。由紫外吸收光谱的性质可知，193nm 附近的吸收峰被认为是 α 螺旋和无规则卷曲构象的主要识别峰，而 β 折叠所产生的特征吸收峰应在波长 198nm 附近。故可推测此 BSA 溶液中没有或极少有 β 折叠构象。

（二）间接反映生化反应过程

用差示分光光度法还可以研究生物大分子与配基之间的相互反应，研究金属蛋白和金属酶中金属离子配位环境的几何构型及其变化过程。差示分光光度法所得的差示光谱，既可用以分析生物大分子与配基之间是否发生反应，提供定性的证据，也可以对这种反应进行定量分析（只要测出 λ_{max}，以及 λ_{max} 时的 $\triangle A$ 吸光度变化）。除此之外，许多大分子物质和配基也可用此方法研究，可研究的配基种类多种多样，包括辅基和辅酶以及一些金属离子。

（三）有助于揭示反应机制

通过对生化反应过程的检测，可以推测反应的机制。人血清白蛋白是由 585 个氨基酸残基组成的单链蛋白质，17 个二硫键维持分子稳定，它在体内起着重要的运输作用，它的铜运输机制以及铜与组氨酸的作用可用紫外可见吸收光谱来分析。在 pH7.4，离子强度为 0.15mol/L，温度 25℃的条件下，[HSA]：[Cu]＝1：1 体系的吸收光谱在 530nm 处有一最大吸收峰，当向该体系加入等摩尔的 L-组氨酸后，最大吸收峰出现在 545nm 处，即发生了红移。若继续增加 L-组氨酸，最大吸收峰逐渐红移，向 1：2 的 Cu^{2+} $(L\text{-}His)_2$ 配合物最大吸收峰（640nm）处靠近。这表明结合在人血清白蛋白 N 端的铜逐渐被组氨酸活化，最终会使大部分铜以 Cu^{2+} $(L\text{-}His)_2$ 配合物的形式存在。

（四）有助于研究酶活性中心的稳定性

利用紫外吸收光谱可以对酶的活性中心进行研究。例如，研究铁硫蛋白的活性中心 Fe_4S_4 簇合物中的 μ_3-S 的酸不稳定性。在表观 pH2.0～3.0 的 Tris-HCl 缓冲液体系中，Fe_4S_4 簇的特征吸收在最初的 2.5min 内急剧减弱，以后基本保持恒定，即表明 Fe_4S_4 在该 pH 条件下分解较快，μ_3-S 极不稳定；在表观 pH3.0～4.0 体系中，Fe_4S_4 簇的特征吸收的相对初始变化率比在上述情况时低，特征吸收的出现可以延续 10min，说明该条件下 Fe_4S_4 分解相对较慢，μ_3-S 的稳定性受到了一定影响；但是在 pH4.0～5.0 体系中，20min 内仍有 Fe_4S_4 簇特征吸收的出现，而且减小速度缓慢，减小幅度微弱，表明在此体系中 μ_3-S 较稳定。

（五）对中药的鉴定

紫外可见光谱具有灵敏可靠、简便快速等特点，其在定性方面另一个突出的应用就是对中药的鉴定。利用紫外光谱法对中药材混乱品种、易混乱品种、难以直观识别品种进行真伪鉴别。

单一光谱法是利用一种溶剂浸泡中药材或其制剂过滤所得滤液在紫外-可见分光光度计上扫描出一条紫外吸收光谱曲线，由此谱线上峰数目与各峰位置鉴定该中药或其制剂，这种方法适用于对同一种中药材的鉴定。为增强紫外光谱的选择性，有人用多种溶

剂提取，分别测试紫外光谱，组成紫外光谱组的方法。在此基础上谋求建立标准图谱库统一标准，使结果更加可靠。紫外光谱法因其自身所具的灵敏性、易操作、价格便宜，将引起更多中药研究者的重视与认可。

根据紫外光谱区检测的是具有共轭体系及助色基团成分的这一特性，在中药鉴别中存在一定的局限性和选择溶剂的繁琐性，为了提高紫外光谱法鉴别中药的可靠性和灵敏性，改一种溶剂为多种溶剂，按极性大小选择 4 种固定溶剂如水、无水乙醇、氯仿、石油醚，利用 4 种紫外光谱上的吸收峰数目、峰位来鉴别中药材。

第五节　进展及发展趋势

紫外-可见分光光度计在不断的发展中，在仪器硬件方面，可协调激光光源的发展促进了紫外-可见光声光谱法的发展，光电技术的发展带动了光路系统的改进和提高。目前，正在研究和应用各种可在全波长同时记录的检测器。例如，硅光二极管阵列、光敏硅片、电荷耦合器件以及在不同波长处两种或三种以上检测器的联用。阵列电荷耦合器（CCD）检测技术的出现，使仪器免去了移动部件，有了极高的波长稳定性和重现性，CCD 检测器可以在扫描单元中获取单一波长下的全部情况。这种检测器有高的量子效率，灵敏度极高，因此在吸收测量中只需微弱的光，降低了样品加热和光氧化的可能性。此外，还报道了可以测量薄膜厚度，抗原层吸附抗体的直接观察装置等。

信号处理方面，由于先进处理软件的出现，操作者无需不断调节仪器的参数，即可有效地获得数据。同时该系统可以根据样品的光密度自动调节检测器积分时间，大大缩短了获取和显示光谱的时间，同时提高了图像的全真性。

数据处理方面，计算机采集和存储技术的提高，使仪器的数据容量得到了大幅度的提高，数据处理的脱机操作，使现代紫外-可见分光光度计不断计算机化、自动化、操作简单化。

随着研究领域的不断扩大，已经出现了专门为有机分析、生物制品分析和核糖核酸研究等应用领域设计的单紫外光谱分光光度计。仪器波长范围在 200～400nm，特别适合于生命科学、基因工程、生物制药、环境监测等行业。同时，传统的分光光度法与各种高效分离方法，如色谱、毛细管电泳的联用和仿生学、化学计量学、动力学和流动分析的结合，必将使分光光度计向着更加综合、实用的方向发展。

主要参考文献

楚振琴．2000．可见-紫外分光光度计的波长校正．山东医药工业，19（6）：38
高宏室．1994．WFZ800-D2 型紫外分光光度计的使用、保养及常见故障分析．淮海医药，（3）：37～38
雷东锋，段淑娥．2001．紫外-可见分光光度计性能评价．西安联合大学学报，4（4）：76～79
李昌厚．1997．再论紫外可见分光光度计的技术指标如何赶超世界先进水平．现代科学仪器，（4）：12～15
石春新，周晓英．2002．紫外光谱在中药材真伪鉴别中的应用．基层中药杂志，16（2）：51～52

王杰．2003．紫外可见分光光度计测光精度和重复性的检查．质量天地，(7)：56
武兴建，吴金宏，吴昊．2001．751-GW 紫外分光光度计故障分析与修理．中国仪器仪表，(4)：47～48
薛萍，郑文杰．2002．紫外可见光谱在生物无机化学中的应用．广州化工，30 (4)：79～82
张剑荣，戚苓．2002．仪器分析实验．北京：科学出版社．57～76
周宏伟，林波海，吴维等．1999．双波长/双光束分光光度计数据处理系统的改进．生物化学与生物物理进展，26 (5)：484～488
周先碗，胡晓倩．2002．生物化学仪器分析与实验技术．北京：化学工业出版社．9～24

第三十三章　凝胶成像系统

计算机尤其是因特网的发展和信息共享对生命科学的发展起到了极大的推动作用。在生命科学的日常科研工作中，将计算机技术和硬件系统相结合，也发展出一些应用广泛、功能强大的分析仪器。由于凝胶成像系统结合了生物处理软件，可以覆盖现代生命科学日常研究的各个领域，并能取代某些专用实验设备，已成为现代分子生物学和其他生命科学实验室的常备仪器（图 33-1）。此外，该系统也用于医学临床检验。

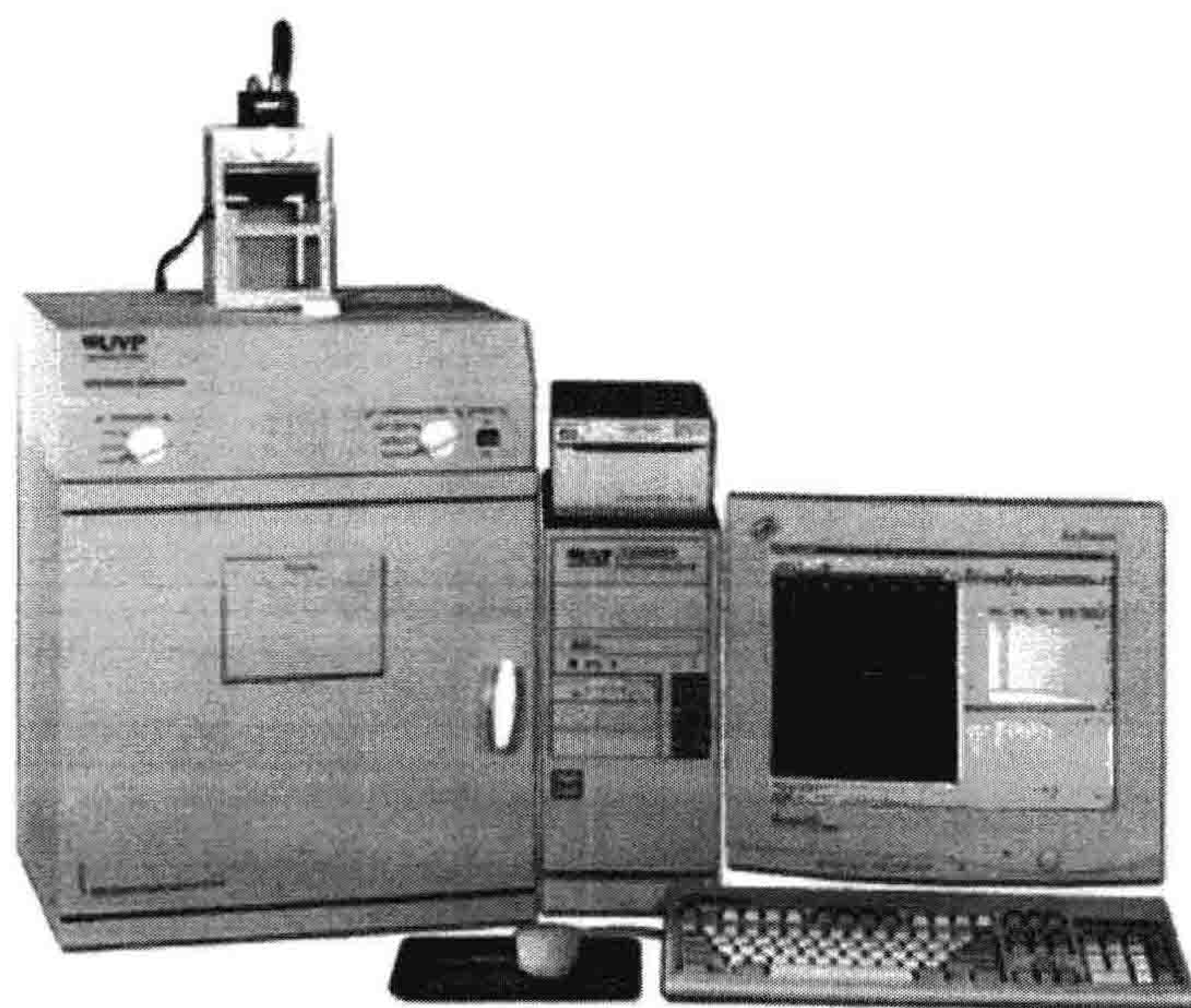


图 33-1　UVP-凝胶成像及分析系统

第一节　基本概念与基本原理

一、基本概念

1. 密度扫描

对指定区域进行光密度扫描，绘制扫描曲线，并计算该区域中各条带的密度积分和峰值，适用于样品相对定量，特别是计算基因工程的产物表达量。

2. 密度定量

对指定区域进行绝对光密度计算，可以通过调整阈值的方法调节条带积分区域，适用于 DNA 和蛋白质的定量分析。

3. 分子质量计算

根据分子质量标记，可以迅速准确计算出凝胶上任意条带的分子质量。

4. 边界识别

自动判读在色彩上有差异的区域的边界，并进行面积积分，在临床诊断上可以用于组织切片的阴阳性程度判断。

二、基本原理

带电物质在电场中的定向运动称为电泳。自1937年首创纸电泳技术后，电泳的种类和应用在深度和广度两方面迅速发展，已成为分子生物学技术中分离生物大分子的重要手段，其中凝胶电泳由于其操作简单、快速、灵敏等特点，已成为分离、鉴定和提纯核酸的首选方法。

电泳结束后应进行凝胶拍照。在凝胶成像系统中，图像分析系统不仅可用于捕获、收集和储存电子图像，还可以进行电脑分析处理。该类系统一般含有CCD照相机和变焦镜头，在电脑中的框式捕获板是用于捕获电子图像的界面，与台式暗室结合，可构成最完善的分析系统。

第二节　组成及性能

一、基本组成

1. PC工作站

要求有一定像素、一定内存的计算机，包括显示器、鼠标、键盘、图像采集卡以及相关的操作系统等。

2. 超动态摄像机

摄像装置是在光照条件不足的情况下观测物体的必需部件，安装在紫外/可见光荧光暗室的上部。

3. 变焦镜头

在安装镜头之前，需要取下保护性外壳，妥善保存以备使用。

4. 紫外可见设备（紫外/可见）

包括紫外过滤器，用于吸收透光器发出的紫外光和红外射线，增强含EB（溴化乙锭）的凝胶发出的橘红色或粉红色的光。过滤器的设计可以使其固定于镜头的前端（注意：在观察培养基时，过滤器没有必要拆卸）。

还包括紫外/可见光荧光暗室，该装置提供了用紫外光或可见光照射的暗室，可见光也可以用于照明。

5. 配件

一般包括彩色热敏打印机、光盘刻录机（外置）、透射扫描仪、全彩色胶片输出仪、

彩色喷墨打印机等。

二、不同型号仪器的性能特点

（一）UVP-实验室图像及分析系统

UVP公司从1932年开始生产供科研、工业及教育应用的一系列实验室用紫外成像设备，成为紫外影像技术的先驱。从1989年开始，UVP率先推出了成套的凝胶成像分析系统，为各大实验室广泛采用。经过多年的应用检验和厂家的不断改进完善，UVP的凝胶成像分析系统以其紧凑的设计，方便的操作，强大的分析软件及较低的运行成本，更高的灵敏度，更完善的功能，成为当今世界销量最多的凝胶成像分析系统。

（二）美国WEALTEC公司凝胶成像系统Dolphin-Doc（1141002）

主要性能特点是对三维摄像头有较强的调节功能，对紫外灯强度也可进行调节，方便分析与割胶。

（三）美国Alpha公司化学发光、荧光、可见光图像分析仪IS-5500

Alpha是全球著名的数字图像、显微图像、扫描图像的专业生产厂家，其图像分析系统在19世纪初崭露头角，其产品以精巧的设计、简单的操作、强大的分析软件迅速得到各科研机构的青睐，现已有数万用户遍及全球各地。

该设备使用的超冷技术可使摄像头能冷却到−40℃，减少了暗电流信号及噪音，同时增强了曝光时间，因此可获得高清晰度和高精度的高质量图片。物质探测限可达3×10^{-15}g。该设备可提供紫外光、白光、彩光（460nm）等多种波段的激发光源的反射光和投射光，可适用于各种化学发光、荧光、普通光的样品。

（四）法国Vilber公司凝胶成像系统BIO-PROFIL 200

该系统主要性能特点是在高频紫外透照台上运用25 000Hz高频电子技术，光源稳定性得以提高。透照台采用双波长、双光强便于切割凝胶。

第三节　操作使用

以UVP GDS7600为例。

（一）仪器的安装

1. 透光器的安装

将装置除去外包装后放置于水平工作台上合适位置。一般厂家都会为透光器提供一个塑料保护性外壳，可以安装在滤光片前的框架上，用来保护使用者不被紫外光照射。如果提供了紫外/可见光荧光暗室，就没有必要安装该保护性外壳。

2. 紫外/可见光荧光暗室

除去外包装后，将四边的螺丝拧松，放置于透光器的上部，再将螺丝拧紧固定。在透光器和暗室之间有一个电源转换插头，此时将其插入配套的电源插座中，电源插座放置于暗室的后部，注意不要将该插头插入交流电源中。

3. 照相设备、镜头和滤光器

照相机在出厂前已经调试完毕，无需做任何调整。在安装照相机和镜头之前，需要拔掉镜头环所属的保护性插头，然后暗室中的镜头就可以安装到照相机上的相应部位，通过调整照相机平板上的螺丝可以进行摄像装置的调整。将照相机前部的透镜环上的塑料塞取下。除去暗室透镜和关闭透镜的外包装，将关闭透镜安装在暗室透镜的前方。最后将紫外滤光器安装在暗室/关闭透镜的前方。整个装置需要安装在照相机的前方，这样照相机就可以对准暗室工作了。

4. 照相设备与暗室的连接

照相设备连接在配套的托架上，置于暗室的顶部，可以从 3 个位置进行拍照。

5. 照相设备与计算机的连接

在处理器后方有 2 个电线插头（15 针和 9 针）。配套有一根导线，一端为 15 针插座，另一端 8 针的圆插头。将 15 针插座与图像采集卡上的 15 针插头连接，8 针圆插头与照相设备后部的相应插座连接。此外还有计算机与打印输出装置的连接。

（二）仪器的使用

目前可购置的仪器功能多样，除了紫外成像，还包括荧光染色、银染、考马斯亮蓝染色、化学发光成像等。在保证正确安装设备后，可以开始使用仪器。具体操作步骤如下。

1）将凝胶放置于透光器的表面，然后将荧光暗室的位置降低。开启照相、计算机、打印机和暗室等所有设备。

2）打开电脑的显示器并开启，进入 Windows 操作系统，相应操作软件中的文件自动生成。双击显示器上相应软件图标，开始工作。

3）采集图像：如果照相设备正确连接，则在显示器上可以看到动态图像。点击红色的照相机图标可以使之成为静态，此时需要点击保存图标保存该图片，图片可以按 BMP、TIF、GIF、PCX、TGS、WPG、JPG 等格式保存。按照 Windows 命名原则给未压缩文件命名。

4）图像分析：将已经获得的凝胶照片用相关分析软件进行分析。

图像下载：利用命令“打开文件”下载图像，使用新图样对话框进行图像格式确认、命名等工作。

图像操作：选择选项/视图按钮调整图像的明暗度和对比度、选择反转可以使图像

反色显示，利用灰度模式（gray scale）选择单色图像还是彩色图像，此外还可以放大、缩小图像。

图像处理功能：包括可自动调节亮度、对比度、伽马调节的图像增强功能，优化、浮雕化、锐化和星形校正等滤镜处理功能。

图像分析功能包括：点杂交、分析、克隆计数和区域密度计算等功能。点杂交工具包括：自动检测及发现点，调节点的直径；克隆计数工具可进行自动计数，结果能进行拆分、加、减处理，能显示表格、图形以及统计格式的资料。区域密度计算既可选择可重复的几何区域，还可选择不规则的几何区域进行区域密度计算。

第四节　在生物学领域中的应用

以计算机凝胶成像系统 SX100 和图像处理软件 Bio Image V2.0 为例，说明其在分子质量计算、密度扫描、密度定量、PCR 定量等生物工程常规研究中的应用。

侧白光用于检测薄层层析及印迹膜。一类分析软件（如 BIO-1D＋＋）有强大的修正计算分析功能；修正弯曲条带，按首尾分子质量标记整体修正因胶不均匀所导致的偏差；计算分子质量、电泳迁移率、光密度值；还可进行 AFLP、RFLP、RAPD 印迹膜分析。BIO-2D 分析软件可测定未知蛋白质分子质量和等电点；统计斑点总数；据斑点强度、面积、周长限定值检出斑点；背景扣除；构建数据库；斑点配比检出差异蛋白。

一、图像摄取

计算机凝胶成像系统 SX100（上海四星生物技术实业有限公司）采用数码摄影将摄取的图像直接输入计算机系统。在暗箱中的紫外灯照射下，通过调节变焦光圈、变焦倍数及焦距使样品清晰且大小适当。获取图像后，通过软件 BioImage V2.0 中图像处理菜单的“亮度”和“优化”项进行亮度调整和图像优化，以降低图像背景噪声。一般经过这样处理以后能得到清晰的凝胶图片，同时在图像中加入文字信息进行适当注释，用热敏打印机或目前常用的高品质照片级喷墨打印机打印以后可以得到符合发表文章要求的照片。

二、分子质量定量

对于一般常用的 DNA 胶片，利用 Bio Image 中分子质量定量功能，通过对胶上 DNA 分子质量标记条带的已知分子质量注释，自动生成拟合曲线，并以它衡量得到未知条带的分子质量。通过这种方法所得到的结果比肉眼观察估计要准确很多。

三、密度定量

一般常用的测定 DNA（脱氧核糖核酸）和 RNA（核糖核酸）浓度的方法是紫外吸收法，但它只能测定样品中的总核苷酸浓度，而不能区分各个长度片段的浓度。利用凝胶成像系统和 Bio Image 软件，对于 DNA 胶片上某一已知其 DNA 含量的标准条带，在调节阀值和积分框并进行密度标定以后，可以方便的单击其他未知条带根据其绝对光

密度值得到其 DNA 含量。该方法比紫外吸收法简便，可以测出不同长度的片段的含量，而所得结果可以满足分子生物学操作要求的准确度。该方法也适用于对聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶电泳蛋白质条带的浓度测定。

四、密度扫描

在分子生物学和生物工程研究中，最常用到的是对蛋白质表达产物占整个菌体蛋白质的百分含量的计算。传统的方法是利用专用的密度扫描，而利用生物分析软件结合现在实验室常规配备的扫描仪或者直接用白光照射的凝胶成像就能完成此项工作。以 Bio Image V2.0 为例，选择密度扫描命令，将代表某一微生物菌株的泳道图像用虚线框住以后，即可得到对此区域的纵向扫描曲线图。一般选择默认的自动积分选项可以自动计算出对应于各个胶带的每个峰面积相对于整个曲线所占的百分比，也可以人工选择积分区域，对于某些条带较弱，背景较深的图谱可以进行基线调整以得到更佳的实验结果并在误差的允许范围内。

五、PCR 定量

PRC 定量主要是指当进行 PCR 实验时如扩增出来的条带不是一条时利用此命令可以计算出各个条带占总体的相对百分数，就此功能而言与密度扫描类似，但实际在原理上并不相同。PCR 定量并不对选择区域生成纵向扫描曲线图并积分，而是对选定的几条带进行相对密度定量并计算其占总和的百分数。

第五节　凝胶成像系统的发展

蛋白质点自动切取机器人平台工作站主要用于二维蛋白质凝胶上蛋白质点的自动切取，可对考马斯亮蓝、银染、荧光染色的蛋白质凝胶进行操作，广泛应用于需要进行高通量蛋白质组学研究。Genomic Solution 公司的 Investigator ProPic 是第一个将二维凝胶成像分析和蛋白质点自动切取两个功能整合在一起的机器人工作站，主要为蛋白质组学研究的后续分析采集和提供样品。

硬件部分：密闭暗箱及带有 XYZ 机器人手臂，具有 100mm 的切割精度，内置可换光源（日光/紫外），能容纳 8 块 96 微孔样品板的样品盘，并装配 Gilson 泵系统和 12 位高分辨率 CCD 数码相机的成像系统。凝胶成像和蛋白质点切取功能的整合，使得成像后凝胶不必移动而原位切取，避免移动过程中产生的位移和污染；切取结束后，可再次原位成像，检查切取结果准确性；可对操作过程实时监控。切取速度达 120 个/h；全封闭的操作环境，可有效防止蛋白质污染；超声波水浴清洗和泵冲洗两种方式清洗枪头，能有效防止样品交叉污染；内置水合装置，能有效避免操作过程中因凝胶变干而影响切取准确性和样品回收率。

软件系统：HT Investigator PC Analyzer and Database 能进行高通量的蛋白质凝胶图像分析，功能强大，处理量大；专业软件 ProPic 能自动控制数码相机曝光和切割机器人的采样操作；可由软件分析自动生成蛋白质点切取列表，也可通过手动模式生成切

取列表，在 8h 的操作周期内完全自动化，结果可靠。

操作系统：Microsoft Windows 98/NT。

主要参考文献

李越，严明，尹光琳. 2000. 计算机凝胶成像系统在生物工程研究中的应用. 现代科学仪器，(6)：29～30

第三十四章 酶 标 仪

1968 年 Miles 等指出，用适当的标记物和免疫学反应物结合，通过测定标记物或标记物产生的二次反应产物来反映初级免疫学反应，可以提高免疫学反应的灵敏性。酶标记物的应用，避免了当时已广泛使用的同位素标记物存在的弊病。1971 年，瑞典的 Engvall 等和荷兰的 Van Weeman 等几乎同时建立了酶联免疫吸附剂测定法（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA），他们分别使抗体结合在用溴化氰活化的纤维素或聚苯乙烯试管壁上，制成固相免疫吸附剂；碱性磷酸酯酶或 HRP 与抗原连接成酶标记物，利用放射免疫测定法的竞争性原理，测定结合于免疫吸附剂上的酶活性。且进一步完善了 ELISA 技术，提出的基本操作步骤沿用至今。

ELISA 法除保留抗原、抗体反应的高度特异性外，由于酶标记物的酶促反应对免疫学反应有放大作用，使测定的灵敏度可达纳克（10^{-9} g）甚至皮克（10^{-12} g）级的水平。这不仅接近放射线免疫法测定的检出水平，并且可避免使用同位素。目前，ELISA 法已在医学临床上、生物学研究上测定各种各样的抗原、半抗原和抗体，特别是在单克隆抗体的研究中，为杂交瘤细胞株的筛选提供了简便、灵敏、快速的测定方法。

近年来，ELISA 法测定技术与其他技术结合发展成为专门的分析方法，如与电泳技术结合的免疫印迹技术，与层析结合的层析-ELISA 技术等，特别是免疫印迹技术在生物化学、分子生物学中广泛用于生物大分子的分析和鉴别，已成为生物实验室的常规技术。

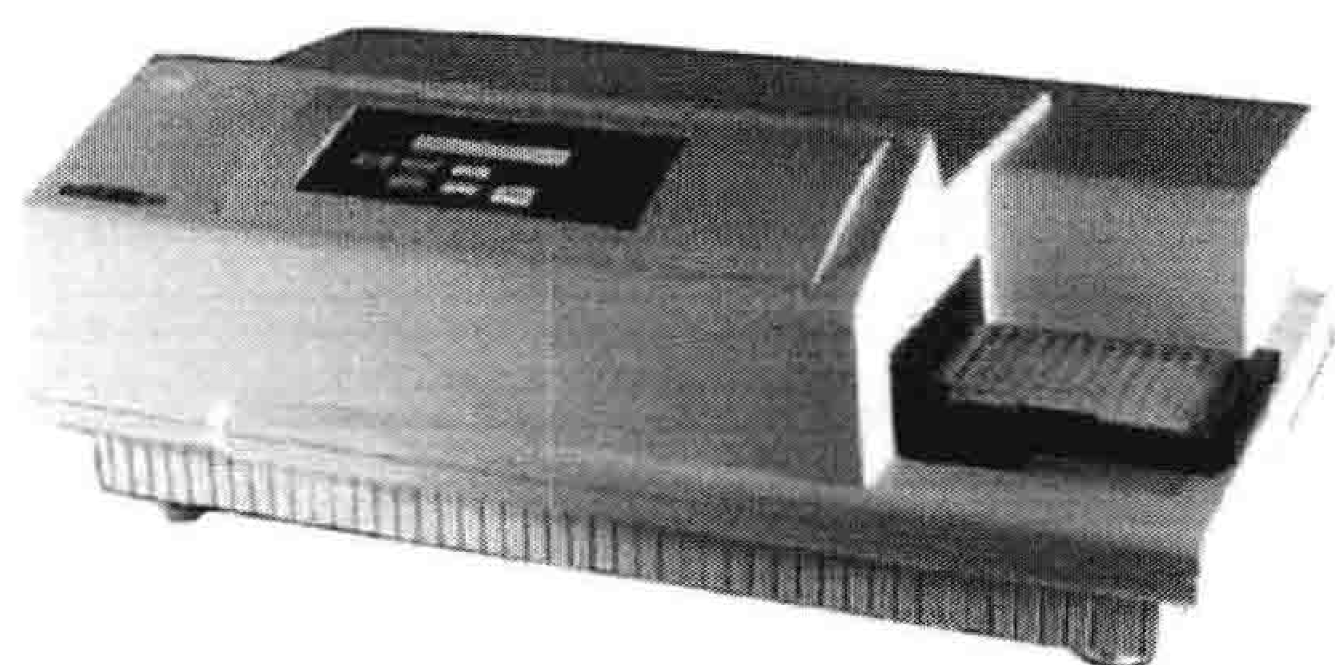


图 34-1 美国 MD 公司微孔板式紫外可见连续波长酶标仪 SPECTERAmax190

酶联免疫测定法是利用抗原-抗体的免疫学反应的实验技术，具有高度特异性，要求参加反应的抗原和抗体纯度高，这样，可以消除非特异性反应和假阳性反应，避免交叉反应，去除内源性酶活性等。所使用的试剂都比较稳定，按照一定的实验程序进行测定，实验结果重复性较好，准确性较高。酶联免疫测定法成本低，操作简便，可同时快速测定多个样品。酶标仪外观如图 34-1 所示。

第一节 酶联免疫技术

一、基 本 原 理

酶联免疫技术就是用酶促反应的放大作用来显示初级免疫学反应。具体讲就是用化学方法将酶与抗原或抗体结合形成酶标记抗原或酶标记抗体，统称酶结合物。该结合物保留原先的免疫学活性和酶学活性，既有抗原-抗体反应的特异性又有酶促反应的生物

放大作用。酶联免疫吸附分析法是把抗原抗体的免疫反应和酶的高效催化作用原理有机地结合起来的一种检测技术，主要有三点依据：第一，抗原（抗体）能结合到固相载体的表面仍具有其免疫活性；第二，抗体（抗原）与酶结合所形成的结合物仍保持免疫活性和酶活性；第三，结合物与相应的抗原（抗体）反应后，结合的酶仍能催化底物生成有色物质，而颜色的深浅可定量抗体（抗原）的含量。

ELISA 法测定过程中抗原、抗体的免疫反应可进行一次或数次，酶促反应只进行一次，免疫反应和酶促反应在微量反应板的测定孔表面进行。ELISA 法有多种类型，在实际工作中根据需要灵活运用。以间接法测定抗体为例简要说明其原理：利用聚苯乙烯微量反应板作为固相免疫吸附剂，吸附抗原，使之固定化，此步过程称之为包被。之后加待测抗体，再加相应的酶标记抗抗体进行两次抗原-抗体的特异性免疫反应，生成抗原-抗体-酶标记抗抗体复合物，最后加入酶的底物，进行酶促反应，生成有色产物，待测抗体的量与有色产物的颜色成正比，用特定波长测定产物的光吸收值即可得到待测抗体的量。免疫多种动物制成的各种抗体、酶标抗体、酶标抗抗体已试剂化出售，便于各种 ELISA 测定。

二、常用 ELISA 测定法

酶联免疫吸附分析法主要有三种测定方法，即间接法、抗体夹心法和竞争法。前两种方法主要用于测定抗体和大分子抗原，适用于临床诊断上，而竞争法是测定小分子抗原的方法。ELISA 测定方法多种多样，根据实验的需要和实验室的条件可以灵活地设计出符合要求的实验方法。

下面举例说明几种常用的测定抗体抗原的 ELISA 方法。

（一）间接法测定抗体效价

首先将过量的抗原加入聚苯乙烯微量反应板的凹孔中进行吸附，洗涤除去未吸附抗原，然后将待测抗体（一抗）溶液加入反应凹孔，温育，形成抗原-抗体复合物，洗涤除去未结合的杂蛋白；加酶标记抗抗体（二抗），温育后洗涤除去未结合的酶标记物，加入底物生成有色产物，加终止液终止酶促反应，目测或用酶标仪测定吸光值，计算第一抗体量（流程图见图 34-2）。

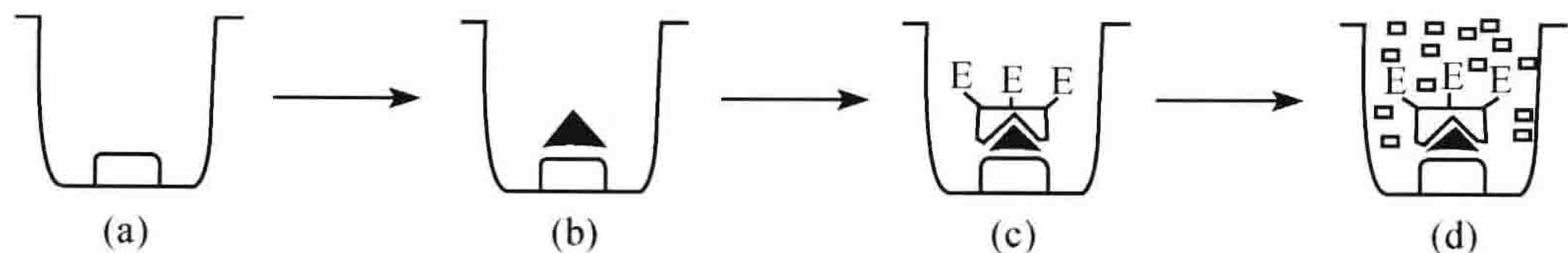


图 34-2 间接法测定抗体效价原理示意图

（a）将抗原吸附于固相载体表面；（b）加入待测抗体，温育，形成抗原-抗体复合物；（c）加入酶标记抗抗体，温育；（d）加入底物生成有色产物，测定吸光值

酶标第二抗体是将第一抗体免疫另一种动物，将抗体纯化再与酶交联而成的。这个方法的优点是只需制备一种酶标抗体，便可用于多种抗原-抗体系统中抗体的检测，免去了逐一纯化并标记各种第一抗体的麻烦，使用商品化的酶标记抗体，经济方便。

（二）双抗体夹心法测定抗原量

首先将抗原免疫第一种动物获得的特异性抗体的免疫球蛋白加入聚苯乙烯微量反应板的凹孔中进行吸附，洗涤除去未吸附抗体，将待测抗原溶液加入反应凹孔，温育形成抗原-抗体复合物，洗涤除去未结合的杂蛋白；再加抗原免疫第二种动物获得的特异性抗体，经温育形成抗体-抗原-抗体复合物，洗涤后加入抗第二种动物抗体的酶标记抗体，温育后洗涤除去未结合的酶标记物，加底物生成有色产物，终止酶促反应，用酶标仪测定吸光值，经计算得到抗原量（流程图见图 34-3）。在此方法中待测抗原必须有两个结合位点，分别和包被的抗体和酶标抗体结合，所以不能用此方法检测半抗原。

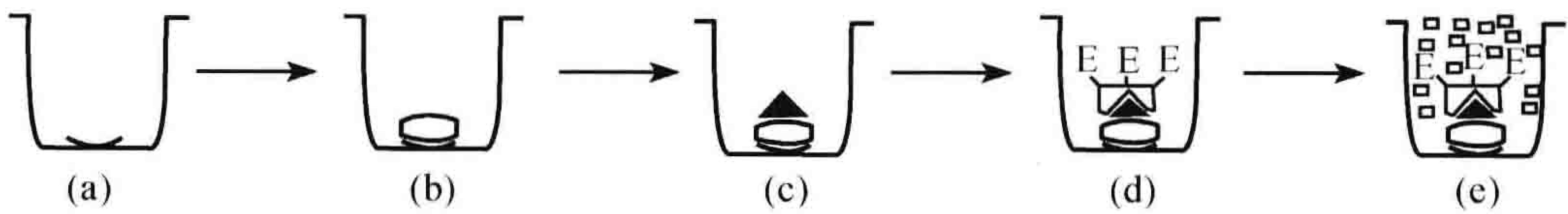


图 34-3　双抗体夹心法测定抗原量原理示意图

（a）将抗原免疫第一种动物获得的抗体吸附于固相载体表面；（b）加入抗原，温育，形成抗原-抗体复合物；（c）加抗原免疫第二种动物获得的抗体，温育，形成抗体-抗原-抗体复合物；（d）加入抗第二种动物抗体的酶标记抗体，温育；（e）加入底物生成有色产物，测定吸光值

（三）竞争法测定抗原量

竞争酶联免疫吸附分析法按实验操作步骤的不同又可分成直接竞争法和间接竞争法。直接竞争法步骤主要有 3 步：第一步，将抗体吸附于固相载体，温育后清洗；第二步，加入含有抗原的待测液及酶标记的抗原，温育后清洗；第三步，加入酶底物，温育后显色，结果判断。而间接竞争法步骤主要有 4 步：第一步，将人工抗原吸附于固相载体，温育后清洗；第二步，加入含有抗原的待测液和抗体，温育后清洗；第三步，加入酶标抗体，温育后清洗；第四步，加入酶底物，温育后显色，结果判断。流程图见图 34-4。将两份相同的含有特异性抗体的免疫球蛋白在载体甲和乙中进行吸附，然后在甲中加入酶标抗原和待测抗原，乙中只加入浓度与甲相同的酶标抗原，甲、乙中的抗原均竞争性地与固相抗体结合，温育后洗涤，加底物生成有色产物。由于固相抗体结合位点有限，待测抗原量越多时，则酶标抗原与固相抗体结合的量越少，酶含量低则有色产物就少。

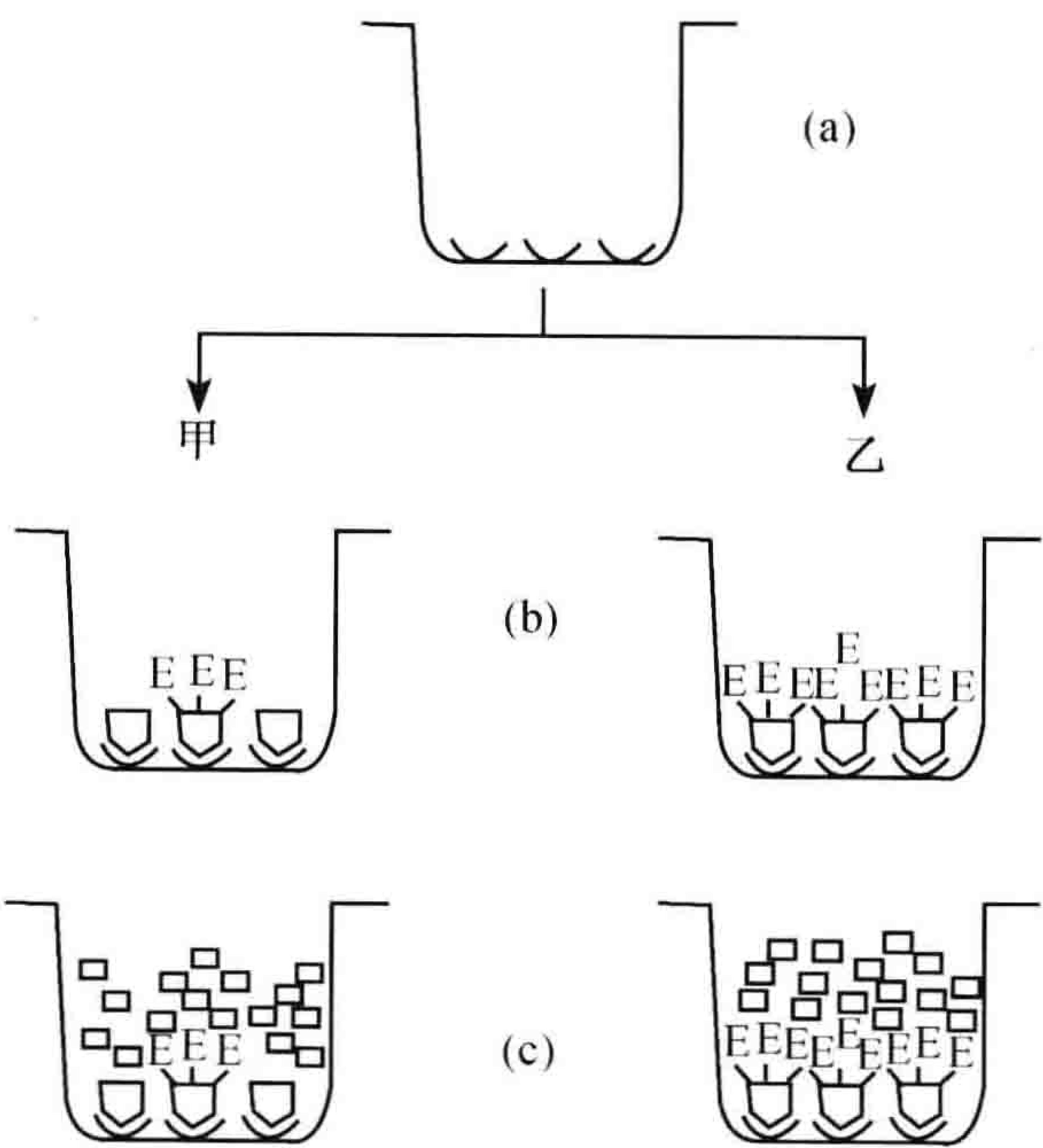


图 34-4　竞争法测定抗原量原理示意图

（a）将抗体吸附于固相载体表面；（b）甲加入酶标抗原和待测抗原，乙加入酶标抗原，温育；（c）加入底物生成有色产物，分别测定光吸收值

因此显色后用乙与甲中底物反应的吸光值之差计算出未知抗原的量。

三、酶联免疫测定的实验条件

（一）包被

在酶联免疫测定法中，将抗原或抗体固定于载体表面，此过程称为包被。包被可采用物理吸附或共价交联的方法。可作为固相载体的物质很多，如聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。ELISA 实验通常采用聚苯乙烯微量反应板，所用样品量少，使用方便，敏感性和重复性好，国内已有生产和市售，价格低廉。

抗原、抗体主要是以物理性吸附作用而固定于聚苯乙烯固相载体表面，过程简单，不发生化学反应，不需要特殊条件，吸附的效果不仅与包被缓冲液的浓度、pH、温育时间有关，还与载体的表面性质有关。缓冲液宜偏碱性，离子强度较低，有利于蛋白质吸附。若包被缓冲液 pH 小于 6.0 时则非特异性吸附增加。实验室中包被蛋白质时常采用 pH9.5，50mmol/L 的碳酸盐缓冲液。聚苯乙烯塑料表面能吸附较多的蛋白质，常用 1～10μg/ml 浓度的免疫球蛋白。浓度过高时，蛋白质分子间的相互作用力妨碍了蛋白质与聚苯乙烯载体表面的吸附，不仅浪费试剂，还会降低检测灵敏度。此外，包被物质必须是可溶的，最适包被浓度可通过棋盘滴定法加以确定，选择阳性孔光吸收值≥1.0、阴性孔光吸收值小于 0.2 的包被物浓度为最适工作浓度。包被温度和时间与固相载体吸附蛋白质的多少有关，多采用 4℃冰箱过夜或 37℃温育 2h，可以达到同样的吸附效果。

（二）封闭

已包被的固相载体与待测样品或酶结合物之间会发生非特异性吸附，降低检测的敏感性和特异性。包被后用牛血清白蛋白（BSA）封闭凹孔中未结合抗原或抗体的部位，封闭液由 1% BSA，0.1% Tween-20（吐温-月桂酸）组成。BSA 属于无关蛋白质，Tween-20 属于非离子型去污剂，用以减少其后各步的非特异性吸附。酶标抗体可以用封闭液稀释，以减少酶结合物的非特异性吸附。

（三）温育

为使酶联免疫测定法中的免疫学反应和酶学反应顺利进行，反应体系需要有合适的 pH 和离子强度，保持一定的温度，并作用一段时间，这个过程称为温育或孵育。在抗原和抗体的结合反应中，低温可提高结合率，高温可加速免疫结合反应的进行。酶联免疫测定法温育一般选用 37℃或室温（18～22℃）。每种测定系统中对温育的时间要求不同，应通过测定其反应动力学来确定。定量测定时选用较长的温育时间以保证结果的准确性，但温育时间较短对于反应的敏感性和特异性有益。

(四) 待测样品

样品中蛋白质浓度过高会产生非特异性吸附干扰固相包被，而过度稀释的血清或血浆样品也会影响抗原-抗体之间的免疫学反应，样品中可能存在的内源性过氧化物酶也会干扰显色反应，克服或减少这些问题的简单办法是采用适当的稀释法。稀释法虽然可减少样品中蛋白质或其他成分与固相的非特异性结合，并降低底物反应时非特异性显色反应的程度，但也可降低酶联免疫测定法的敏感性。

(五) 洗涤

ELISA 操作过程中无论是免疫反应还是酶促反应，每次反应后都要反复洗涤，除去未反应的游离抗原或抗体、酶结合物，保证反应的定量关系。如固相载体包被后，洗涤除去未吸附的包被蛋白；待测样品与固相温育后，洗涤除去未结合的免疫反应物及无关杂质，终止抗原-抗体继续结合；酶结合物与固相温育后，洗涤除去未结合的酶结合物。洗涤的效果直接关系到 ELISA 的检测结果。洗涤液是含 0.05% Tween-20 的 PBS，pH7.2 或 7.4，洗涤液中加入 Tween-20 是为了减少非特异性吸附。

(六) 底物

各种免疫酶技术在测定中都是以酶的底物显色反应来揭示待测物质，不同酶要选择相应的不同底物。酶联免疫测定法对底物的要求是经济易得、安全、稳定性好，本身无色，反应后显色明显，还要求底物的产物可溶，终止酶催化反应后底物不再继续自发性变性。ELISA 测定中可供辣根过氧化物酶（HRP）使用的底物较多，实验室中最常用的是邻苯二胺（orthophenylenediamine，OPD）和 3，3′，5，5′-四甲基联苯胺（3，3′，5，5′-tetramethylbenzidine，TMB）。OPD 和 TMB 经 HRP 催化反应后生成橘红色或黄色产物，底物温育时间短，在暗处稳定，显色结果可用目测法或比色法判定。

酶结合物的催化作用随时间的延长而增强。但随着酶催化时间的延长，某些底物会产生自发的变性，干扰实验结果。因此要控制酶结合物的浓度和反应温度，酶促反应时间一般控制在 20～60min，常用强酸或强碱终止反应。由于 HRP 催化的是氧化还原反应，无色供氢体可被空气中的氧气氧化，因此底物溶液必须现配现用，以保证新鲜。

(七) 结果测定

ELISA 测定中，HRP 和碱性磷酸酯酶等酶结合物催化底物后的显色反应可用目测法观察颜色的有无及深浅，也可用分光光度计测定溶液的吸光值。目前，国内外均有专用于 ELISA 测定的分光光度计，又称酶联免疫测定仪，简称酶标仪，专为 96 孔固相反应板设计，自动化程度高，使用方便，设定波长后，可自动读出各孔的吸光值并打印出来。

目测法一般作为“有”或“无”的定性结果判定。在实际操作中，都没有阳性对照，而是以阴性对照进行比较，当待测样品的显色程度较阴性对照深时则可判为阳性。

生物实验室常用的方法是将待测样品连续稀释用于检测，以显色程度比阴性对照颜色深时的最高稀释度作为抗体效价，此方法可以目测或酶标仪定量测定相对的抗体活性，但样品连续稀释时易造成误差，反应靠近终点处光吸收变化小，结果重复性较差。实验室也有使用光吸收法和比例法。光吸收法是用酶标仪测定产物溶液的吸光值，测定若干个阴性对照的光吸收定出其上限，则规定待测样品中吸光值大于该上限者为阳性。该法的优点是测定时样品只需一个稀释度，测定的重复性好；缺点是光吸收值与抗体效价之间不成线性比例关系。比例法以阳性血清与阴性血清的吸光值之比（positive/negative，*P*/*N*）来表示，当 $P/N>2.1$ 时为阳性，$1.5<P/N<2.1$ 时为可疑，$P/N<1.5$ 为阴性。该法只需一个样品稀释度便可完成，但阴性对照的吸光值太低，待测样品的阳性率就会很大，*P*/*N* 值与抗体效价之间不成线性比例关系。

四、影响因素与注意事项

酶联免疫测定法的免疫反应部分中，抗原-抗体的亲和力、抗原和半抗原的性质、测定方法的实验条件、酶标记物的性质等因素影响反应的敏感性。在酶学反应部分中，酶的浓度、底物的浓度、反应 pH、温度、酶的抑制剂和激活剂等因素也影响反应的敏感性。需要注意以下几点：

1）待测样品溶液中不能存在与标记酶相同的酶、底物、酶抑制剂和其他干扰因素，以防止干扰作用。

2）聚苯乙烯反应板测定时，溶液宜垂直滴入凹孔中间，相继加入的溶液都覆盖相同的载体表面积。在吸附、温育和洗涤等操作中应避免剧烈振摇、搅拌等，以保证恒定的吸附容量。在洗涤操作中，由于聚苯乙烯反应板凹孔容量小、孔间距离近，故洗涤时要注意每次加入的洗涤液量既要达到洗涤充分又要避免相邻孔内液体互相污染。

3）在 ELISA 中血清阴性对照的显色反应常常是因酶结合物与固相之间的非特异性吸附所致，可在酶结合物稀释时中加入去污剂（如 Tween-20）或非特异性蛋白质（牛血清白蛋白），减少酶结合物的非特异性吸附作用。稀释的酶结合物置于室温条件下过久，会影响底物的显色反应，所以酶结合物应在使用前稀释。

4）一些底物如 OPD 和 TMB 在暗处稳定，底物溶液要现用现配，酶促反应时注意避光。某些含苯环的底物有致畸变作用或致癌作用，使用时要多加小心，测定完数据后，收集反应溶液，集中处理，不要流入下水道。

第二节　酶　标　仪

一、组成与结构

酶标仪实际上是以微孔板为比色容器的比色计，入射光通过板孔底部进入比色液，利用板的移动更换比色对象。为能取得标准的测读结果，入射光必须对准孔的中央，板的移动位置应保持准确，移动后，复位时测读结果应具重复性。其光学示意图如图 34-5 所示。

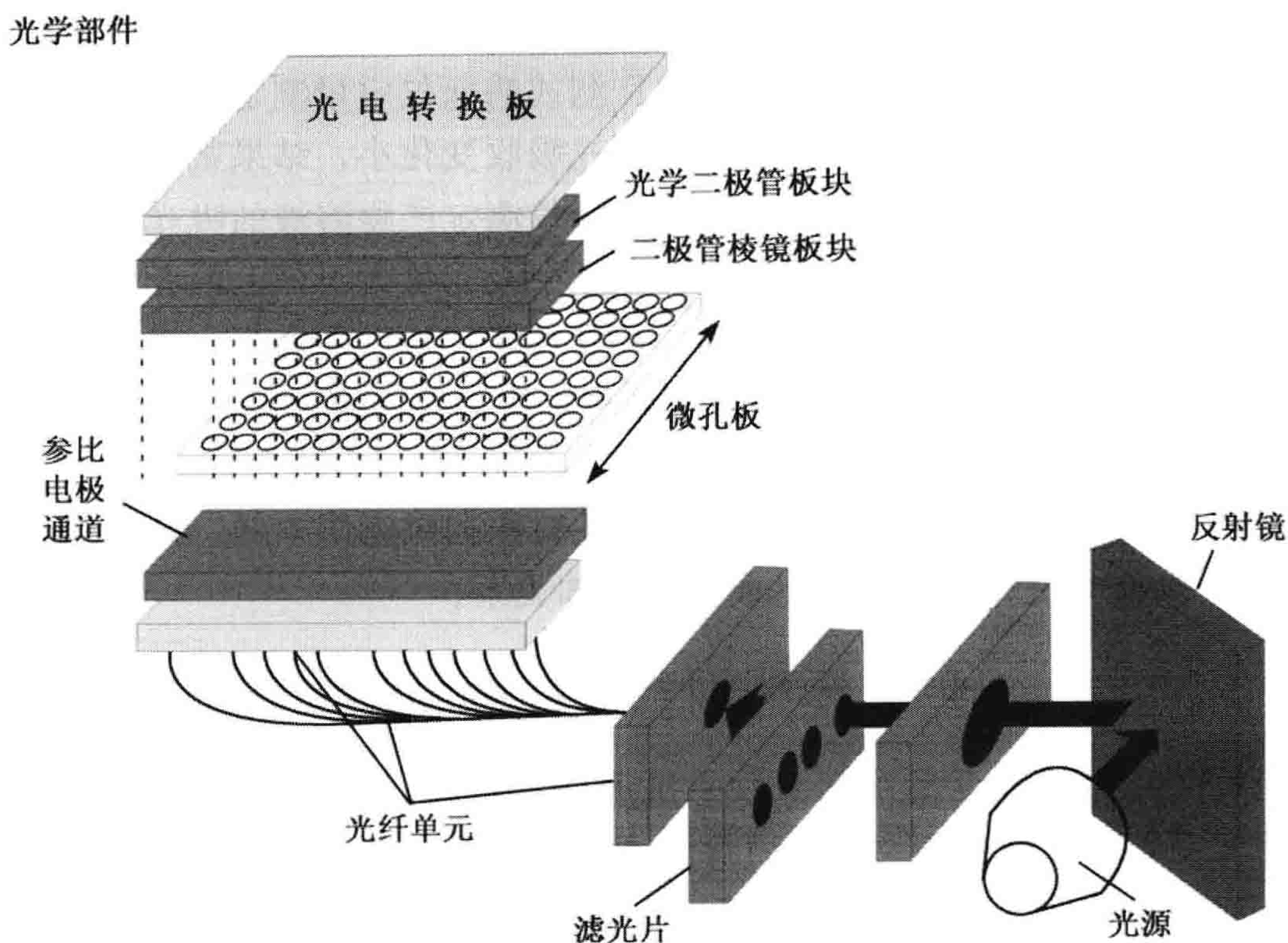


图 34-5　酶标仪光学示意图

二、不同型号酶标仪的性能特点（以 SLT 公司酶标仪为例）

SLT 酶标仪为临床检验、试剂生产、防疫、血库、医院等提供了精密、准确的检测，是灵活性与功能性完美结合的产物。

（一）型号 SPECTRA IMAGE

可以履行标准的光度计功能，而且外置提供肖像功能，有许多软件可供选择。可以读取任何类型的板，对于比标准板小一些的板，可以使用特殊的适配器。通过 CAPTURE 软件，用户可单击鼠标调出 96 孔标准板上的数据，*OD* 值可被粘贴到另外一个程序中，或者进行存盘。

（二）型号 SPECTRA THERMO

有独一无二的温度控制系统，保持温度在 20～42℃，可进行温度控制的动力学研究。成熟的温度控制系统保证了精确的温度和微板上微小的温度波动。由于盖上附加有加热元件，因而挥发率降低到最小限度。它可应用于内毒素测试、LAL 测试、转氨酶分析、酶动力学研究、生物活力的确定等。

（三）SPECTRA Rainbow 系列

该系列有独一无二的机械控制、优秀的灌录设置、微程序语言保证了最大的操作灵活性与精确性。光源由高质量的卤化灯发出，被镜面反射后，由棱镜聚焦。聚焦后的光

束，通过滤光片中的光纤将光线分成测量光束和一个参比光束。光的强度由 12 个二极管测量，然后放大，并通过 A/D（模拟/数字）权转化成数字信号。两种测量模式允许用户选择使用。增强模式对每一个孔可实行 165 次测量，然后取平均值；标准模式对每一个孔进行较少的测量次数，因而读板速度更快。连续可调波长，有独特的机械控制，光学矩阵和固定存储器的微机程序控制其正确的测量。

（四）MINILYSER 全自动系列

自动进行各种 ELISA，自动加样，自动清洗，自动摇匀，自动孵育，自动读取含有 20 个试验的 4 个板。

（五）荧光酶标仪

荧光酶标仪为一微机控制的荧光光度计，专为涉及荧光的酶标工作设计，如荧光免疫分析、DNA 及蛋白质定量分析、细胞繁殖测试、单克隆抗体检测等。微机软件是一真正的多用途单元，除了有积分功能外，更能在处理反应的同时，阅览比较以往的记录。此外，微机设备还能精确控制温度，从室温至 42℃，并能清楚指导使用者完成编程。光学系统能从酶标板上方或下方做检测，能使用全黑或全白的专用酶标板，能使用 60 孔黑白或透明 96 孔酶标板。

（六）CAFCA 酶标仪

使用同位素细胞标记定量分析白细胞对细胞外配体及细胞内皮，费时费力，重现性较差，而且无法对毛细管血液中细胞和组织的生物检测进行分析，尤其是无法对细胞配体的亲和能力做检验。荧光细胞黏合离心分析（centrifugal assay for fluorescence based cell adhesion，CAFCA）克服了上述局限性，该方法依赖于细胞的荧光标记以及专用的读数板。分析过程包括两个离心步骤以及用荧光酶标对结合细胞的结合比例进行定量分析。该方法比传统的分析方法快 10 倍，无毒，低成本，更重要的是对人和动物细胞的黏合行为的分析具有高度的专一性。该实验操作步骤为：

1）荧光标记的细胞加入含有底物、培养基、PVP 缓冲液的微板中。

2）微板离心 5min，并在 37℃条件下孵育 20min。

3）将孵育后的细胞所在微板加盖帽子。

4）反向离心。

5）对帽子和底部微管用荧光酶标进行测量。

6）求算顶部和底部荧光比率，进而对结合的比率进行计算统计。

该方法主要应用于细胞和细胞之间、细胞和底物之间黏合性实验的定量定性分析；动物和人体细胞联合（cell-line）行为；初级培养中的细胞黏合行为进行定性定量分析；从健康或正常个体中分离的细胞进行定量定性分析；细胞和细胞之间、细胞和底物之间亲和能力的评价。优点是无同位素，高重现性，高精确度，快速，适合于小数量细胞多参数的灵活性分析。

第三节　操作使用

一、故障排除与维护

1. 显示故障

故障现象：开机电源指示灯亮，液晶显示屏能显示字符，但显示时间较短。

故障分析：导致此种现象有两种可能，一是液晶显示器驱动-控制电路出现故障；二是供给液晶显示器的电源电压不正常。

故障排除：打开仪器上盖，通电观察带散热片是否发热，若发热，可用数字万用表直流电压档测三端集成稳压块输出端，观察有无电压输出；若没有，说明电源有故障。因三端集成稳压块内含过流限制和过热保护电路，为了判断是三端集成稳压块的故障还是后级负载短路引起的故障，可将仪器母板上三块电路板逐一拔出，通电再测量三端集成稳压块输出端电压，若拔出液晶显示驱动-控制这块电路块时，三端集成稳压块的输出端电压恢复正常，则可初步判断是电路板上的负载有短路现象，仔细检查该电路板直流供电系统的各个元器件，可能为以树脂壳包装的铝固体电解电容器已击穿造成短路等原因。换上用相同规格的电解电容器，即可排除故障。

2. 频繁校正波长

故障现象：大多数酶标仪本身具有自我检测系统，包括波长自动校正系统。进入工作状态以后，某一部分不能通过检测时，电脑显示屏上出现误差号码，以方便排除。用户手册一般标明酶标仪上的波长校正应每 2 个月进行一次，或是在装了新的滤光片后进行。如需频繁校正，或当擦拭过透镜才能恢复正常工作，则说明发生故障。

故障分析：在进行酶标比色时，检测标本的微孔反应板中，最后每孔内加入的硫酸或其他酸性终止液是造成故障的主要原因。用户在建立新的检测项目时，由于需要自编程序、吸光度值修改以及曲线建立校正，往往比色时重复次数多，花费时间长，微孔反应板内的硫酸或其他酸就会挥发在 CPU 板舱内。有时由于疏忽，比色完后忘记将微孔板取出，待发现时硫酸或其他酸已全部挥发在 CPU 板舱内。长此以往，酸性气体对舱内顶端透镜和底部透镜造成污染，甚至对光路可能也有一定的不良影响，所以需要频繁地擦拭透镜和校正波长。

维护：需要在待测的微孔反应板上加覆盖物，使酸性气体挥发不出来。由于 CPU 板舱入口处高度的限制，覆盖物不能超过一定厚度，微波炉用食品保鲜膜具有吸附性好、透光率强、使用方便、价格低廉、购买容易的优点，可以选用，或用超薄型玻璃覆盖在微孔板上。

3. 程序丢失

故障现象：用标准方式开机后，计算机不进入综合画面后，定性、定量中的某一程序找不到，无法开展日常工作。

分析维护：虽然在系统安装程序中，要输入密码指令，使用户自编的样本程序文件及软件本身免受更动，但这仅仅保护了在启动 ELISA 程序后的软件。如果酶标仪上整个 ELISA 程序是在标准的 DOS 环境下工作的，打开文件库就能看到所有的文件，若在 DOS 状态下删除旧文件时，很可能弄乱了 ELISA 文件，从而造成上述故障。在对酶标仪进行维修保养后，可以找回丢失文件，需要并把整个 ELISA 文件在 DOS 系统中隐藏了起来，让一般人开机后既看不到文件也无法删除。最好在酶标仪刚购置时就将文件加密隐藏，则不会出现上述故障。

4. 打印故障

故障现象：打印机在工作中时常报警，有纸情况下电脑上却显示缺纸，还常将 2 张或 3 张纸重叠起来输入打印机甚至造成卡纸现象。

分析维护：检查室内空气湿度，若湿度较高，会导致打印纸吸湿后黏附在一起，造成上述故障。可将打印纸使用前先放入 37℃烘箱内烘烤后，拿出后将纸抖开，每次机上放纸不要超过 10 张，可排除上述故障。

二、使用注意事项

1. 阈值可疑范围的设定

一般酶标仪阈值矩阵设定可设定阴性、可疑、阳性 3 个范围。有经验表明可疑范围的设定要设定为临界上下 15%（也称灰色区）为宜；同时阴性范围下限和阳性范围应该充分考虑到影响 ELISA 结果因素的存在，可疑范围上限必须考虑到双波长情况下出现负吸光度值和超范围报告影响结果的可能性。“灰色区”的结果的真实性是 ELISA 定性测定中最需要把握的环节，也是实验室引起医疗纠纷的主要方面，因此必须对可疑结果进行复检，最好用两种试剂盒。

2. 样本名字文件设定

由于部分试验的所测样本不一定是连续，样本命名显得尤为重要。同时应做到样本名字文件与吸光度值文件保持一致，这样若以后再调出吸光度文件时，样本名字文件可自动同时调出；若大批量样本时应对不同微孔板编号区别（以文件后缀形式）。

3. 样板程序文件设定

一个实验室同一试验可能使用不同厂家试剂盒，但不同试剂盒规定的设定对照数量、阈值判定标准等均可能不一致，酶标仪所设样板程序也不一致。为了使用方便，可在样板程序文件中用后缀加以区别。

4. 记录管理

随着我国法律的不断完善，人们的法制观念不断增强，建立健全原始记录十分重要和必要。原始记录不仅是仪器打印出来的数据，还应记录试剂盒厂家、批号、效期、质

控物来源、批号、效期、检测者、复核者等相关内容，同时可用原始记录进行资料分析，更好地开展工作。但要注意的是原始记录不宜保存在电脑内，应打印后装订保存。

第四节 酶联免疫技术在生物领域的应用

1）酶联免疫组织化学技术用于组织细胞上抗原、抗体成分的定位。

2）酶联免疫测定法用来检测液体中可溶性的抗原、抗体成分。

3）酶联免疫技术中的竞争法是测定小分子抗原的方法，尤其适用于食品卫生分析。食品卫生分析中所需测定的物质大都是低分子质量的，但免疫动物产生抗体的抗原其相对分子质量要求必须很大（至少 50 000），因此，首先必须将小分子物质结合上高分子蛋白质，才能作免疫之用，而为了能使小分子物质结合上高分子蛋白质，则必须在小分子物质上导入一个活性基团，同时直接竞争法所需的酶标抗原的制备也需首先在小分子物质上导入一个活性基团。由于该化学修饰反应有一定的技术难度，有关专家就采用了间接竞争法来改进测定步骤，用酶标抗体代替了酶标抗原，因为酶标抗体的制备技术相对比较成熟，并有现成的商品，然而这却使整个实验操作过程不如直接竞争法那么简便快捷。竞争酶联免疫吸附分析法有特异性强、干扰小、样品的预处理简便、快速、高效的特点，并且对设备装置的投资较少。

第五节 免疫技术与酶标仪的发展

（一）试剂微量化

由于样品检测过程中有时需要对仅有的少量样品进行检测，而且由于检测样本数量大，因而要求进行微量检测，从而能够达到节约样品、试剂的目的。进行微量检测对于仪器的灵敏度的要求大大提高，因此一些更加灵敏的检测方法和新技术就被运用到酶标仪中，从而提高了仪器的灵敏度，克服了检测过程中样品、试剂有限的问题。

（二）检测能力大大提高

由于酶标仪在医院中使用较多，检测任务重，需要同时检测大量样本，这就要求酶标仪有足够的检测能力。这主要表现在微孔板上微孔数量的多少，从以前的 48 孔到目前最常见的 96 孔板，酶标仪的检测能力大大提高，为快速诊断提供了保证。

（三）新技术的运用

瑞士雪兰诺诊断中心发明的磁分离酶联免疫是一种非同位素标记的酶免疫检测技术，称为磁性抗体免疫技术（MAIA）。该方法是一种非同位素标记的免疫测定法，与其他检测方法不同之处在于它是以一种 1μm 直径大小的磁性微粒标记抗体结合待测物质，通过固定磁架上的磁铁吸附磁性微粒沉淀，从而达到分离的目的，反应过程均在液相中进行，不仅反应速度较快，而且充分，时间明显少于固相分离。该方法绘制出的标

准曲线相关性良好，线性范围宽，显色结果稳定，重复性较好，准确度高。

除了以上 3 大趋势外，根据不同需要研制的不同类型的酶标仪也不断涌现，如全自动荧光检测酶标仪、温控酶标仪等，这一类型仪器的发展，必将对医学诊断、免疫学研究等领域的工作起到巨大的推动作用。

主要参考文献

刘靖．2002．Σ960 型酶标仪故障维修一例．医疗装备，(8)：45

马爱宁，黄国平，周樱．2000．128C 酶标仪常见故障及分析维护．医疗装备，(11)：51～52

施根林．2002．Clinibio 128C 酶标仪使用经验．医学装备，15 (6)：18

王建林，邹均，帅欣．2003．磁分离酶联免疫检测激素的方法学评价．贵州医药，27 (9)：394

第三十五章 核磁共振波谱仪

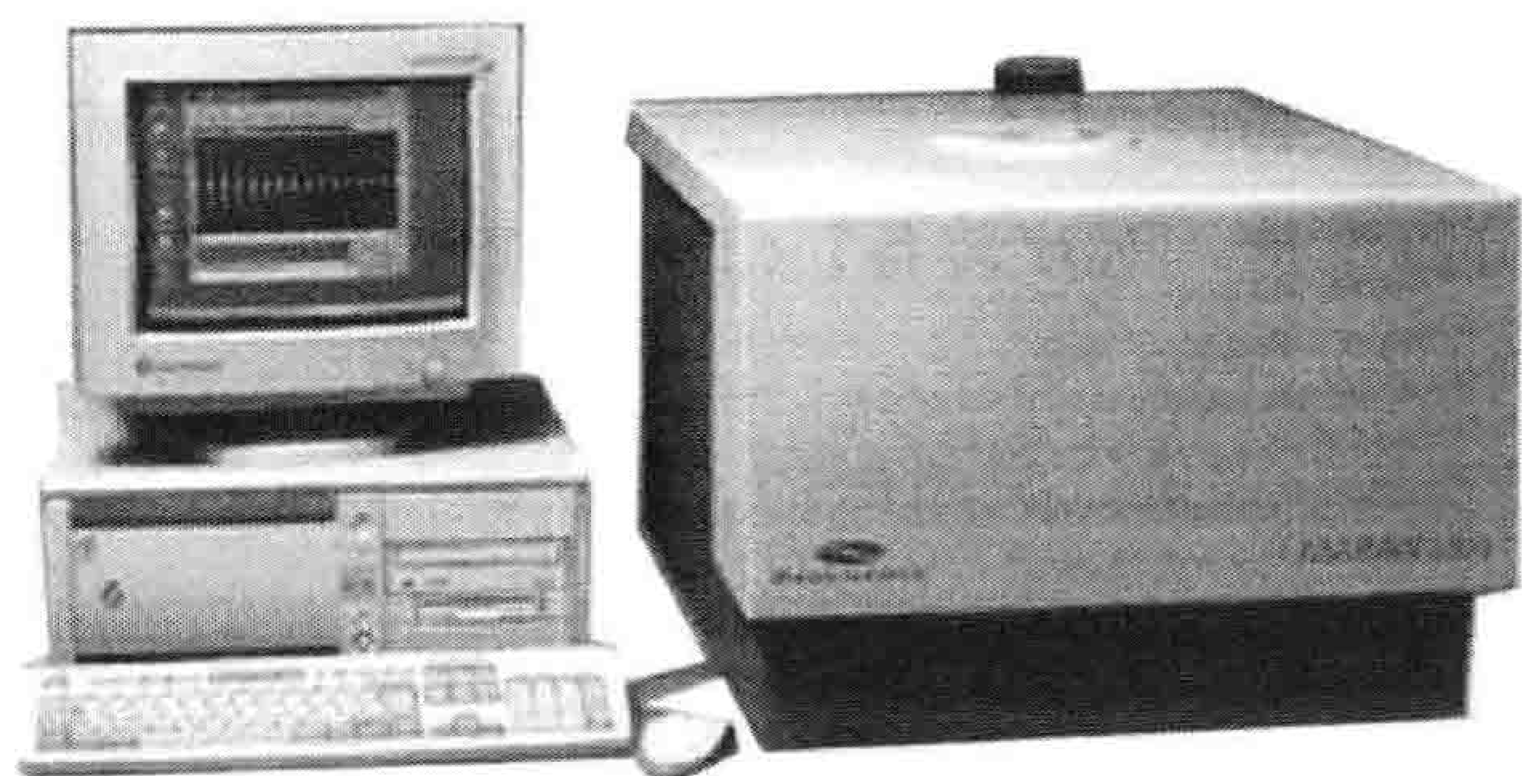


图 35-1 英国共振仪器有限公司超级 MARAN系列台式核磁共振（NMR）分析仪（来自 www.instrument.com.cn）

核磁共振波谱法是研究某些有磁矩的原子核在静磁场中由于磁矩和磁场相互作用形成的一组分裂的能级，在合适频率的射频作用下，能级间发生跃迁的现象。核磁共振波谱仪是利用核磁共振现象研究化合物结构的装置，在化学中主要是用来测定分子的化学结构，尤其是天然存在的复杂有机分子结构。其外形如图 35-1。此外，核磁共振技术也是研究生物大分子的动力学性质、生物大分子之间及大分子与小分子相互作用的重要手段。

第一节 基本概念与基本原理

一、基本概念

（一）原子核自旋和核磁共振

原子核为带正电荷的近似球体。自旋量子数等于零的原子核，如 12C、16O、32S 等，没有自旋现象，也不能产生核磁共振。自旋量子数不等于零的原子核，如 1H、2H、3H、13C、14N、31P、19F 有自旋现象，可以发生核磁共振。

原子核自旋产生核磁矩（μ）。在外加磁场中，原子核不但有自旋，而且还有进动，即自旋轴以固定的角度绕外加磁场方向旋转。其进动频率（υ）与外加磁场强度（H_0）成正比。

核自旋轴与外加磁场方向的夹角是量子化的，只可能有 $2I+1$ 个数值，即只有 $2I+1$ 个能级。I 是原子核的自旋量子数。其数值与原子核中的质子数和中子数有关。相邻两个能级之间的能量差都是$\triangle E$。如果有量子能量等于$\triangle E$ 的射频电磁波照射原子核时，则原子核便吸收射频电磁波的能量，从低能级跃迁到相邻的高能级上。这种吸收，称为共振吸收，即核磁共振（nuclear magnetic resonance，NMR）。产生核磁共振的条件为照射到原子核上的射频电磁波的频率应等于原子核进行频率。这不仅与原子核的特性有关，而且还与外加磁场强度有关。

产生核磁共振和测定原子核共振频率有两种方法：一种是固定外加磁场强度，改变射频电磁波频率（频率扫描），可以产生核磁共振，并测定共振时的频率；另一种是，固定射频电磁波频率，改变外加磁场强度（磁场扫描），可以产生核磁共振，并测出共振时的外加磁场强度。在实际应用中，往往采用后者。二者所得到的图谱，都称为核磁

共振波谱（NMR 谱），产生核磁共振波谱的仪器是核磁共振波谱仪。

（二）核磁共振波谱与分子结构的关系

NMR 谱包含着许多与分子结构有关的信息。下面简单介绍用 NMR 谱进行分析推测分子结构的过程。

1. 化学位移

前文所说的核磁共振，是将原子核孤立起来的，并假设它的周围没有电子流或其他原子核的存在。但是，在分子中，原子核的周围或附近，还有电子流或其他核的存在。对于电子流来说，只要其存在，就存在一个磁场。原子核周围的电子云，在外加磁场中产生感生磁场，其磁场方向与外加磁场方向相反，致使该原子核实际受到的磁场强度变小。为了使该核产生核磁共振，必须适当增加外加磁场强度，以抵消电子云对该原子核的屏蔽作用。这种由于屏蔽作用所引起的共振使外加磁场强度的移动，被称为化学位移。屏蔽作用的大小与核外电子云密度有关，后者又与原子核的化学环境有关。化学环境不同，不同的电子云密度分别对各自的质子产生大小不同的屏蔽作用。因而，不同基团的质子分别在不同的外加磁场强度下产生核磁共振。根据化学位移，可以确定原子在分子中的排布，确定分子中的功能基。

影响化学位移的主要效应如下：

（1）磁各向异性效应

由于苯环 π 电子云的影响，使处于环上方和四周的氢核的化学位移有极大差别。处于 A 区的氢核，需要较高的外磁场强度才能产生共振；处于 B 区的同类核，在较低的外磁场强度下就能产生共振。这就是磁各向异性效应。利用这种效应，可以测定氢核与多元环的相对位置。

（2）顺磁效应

某些离子及自由基都具有不成对电子，即具有顺磁性，它们对周围原子核的化学位移有很大的影响，其影响的大小与核和顺磁离子之间的距离的 6 次方成反比，这就是顺磁效应。不少蛋白质分子的活性中心有顺磁离子存在，因而有顺磁效应，利用该效应可以测定活性中心的结构等。

（3）化学交换效应

与 N、O、S 等原子相连的氢原子，在水溶液中常常发生质子交换。改变溶液的 pH 可以大大改变上述质子交换的速度，从而大大改变上述质子的化学位移。以化学位移对 pH 作图，可以得到滴定曲线。从滴定曲线可以测知大分子中同一种残基的不同解离状态，从而得知其化学环境，得到结构与功能的信息。氢键的形成，使质子交换变慢，从而使质子的化学位移增大，因而 NMR 技术是研究氢键的有力工作。

2. 自旋耦合

基团之间由于核自旋磁矩的相互作用，而使一条谱线分裂成多条谱线，这种作用称为自旋耦合或自旋-自旋耦合。裂分共振谱线能量差，称为自耦耦合常数，用 J 表示，

单位是周/s。J是 NMR 的重要参数，如果是一维 NMR 谱，可由谱线分裂峰距直接测定 J 值。J 与 H_0 无关，与分子结构有关，与耦合核的二面角有关。根据自旋耦合所产生的谱线的精细结构，可以了解分子中基团之间的相互关系，从而确定其相对排列位置，确定分子的空间结构。

3. 核的奥氏效应

双共振实验是同时用 2 个射频场（射频电磁波）作用于同一样品。一个称为干扰场，激发作用核，使之发生跃迁；另一个射频场用来激发观察核，使之产生共振，观察图谱中精细结构变化，以确定作用核与观察核之间的耦合关系。如果有 2 个核在空间彼此很近，用射频电磁波对第一个核进行激发，由于能量转移，而使第二个核的信号增强。这一效应称为核的奥氏效应（nuclear overhauser effect，NOE）。NOE 的大小与核间距的 6 次方成反比。因此，利用 NOE 可以确定核间距，这对空间结构的确定十分有用。

二、影响实验的因素

（一）匀场过程中的几个问题

1. 换上样品后找不到氘信号

这种情况一般是由于样品的溶剂发生了变化。

2. 锁场电平不稳

如果锁场线呈现出无规则的大起大落，问题大都源于锁场功率太大而导致锁场信号饱和。

3. 测得的信号表明场并不均匀，但锁场电平却难以提高

首先检查锁场相位是否准确。但是如果问题不是出在锁场相位，就要尝试大幅度地调整某一旋钮，有意识地使匀场电平降低，然后再调整其他旋钮。

（二）一维实验中的问题

1. 谱中无任何信号

产生这种现象主要原因是硬、软件出现故障，参数设置不对，探头调谐不好等。

2. 谱的基线不平

这种现象常常出现在谱的信噪比很差时，对所有核都有可能。

3. 90°脉冲测不准

对于 1H 谱，一般不会有这种情况。有两种情况容易造成 90°脉冲测不准，一种情

况是溶剂峰很强时；另一种情况是所观测的信号弛豫时间特别长。

（三）二维实验中的问题

1. t 噪声

由于在二维实验中不能随意地将 90°脉冲换成小角度，所以解决这个问题只能延长脉冲序列前的弛豫等待时间。

2. 二维谱中出现反对角线峰

主要原因是 90°脉冲不准及相位循环不完全。

（四）定量实验中的问题

1. 积分精度低

因信号的积分受到众多因素的影响，不可能有很高的精度。如在对简单谱积分时，积分为 1、0.9 甚至 0.85 的峰都有可能代表 1 个质子。

2. 弛豫时间测不准

对于高浓度的样品进行弛豫时间的测定，应采用饱和恢复法将磁化强度饱和，使辐射阻尼在磁化强度的恢复期间不产生作用，然后在数据处理时应采用积分数据而不要使用强度数据。

第二节　结构与性能

一、组成结构

核磁共振波谱仪一般分为 4 个主要构件。

（一）射频振荡器

射频振荡器用于产生射频电磁波。一般将样品放在射频振荡器的电感应线圈中，以接受射频电磁波的照射。

（二）磁场系统

磁场系统包括磁铁、磁场电源、稳定装置等，为自旋原子核产生均匀的外加磁场。

（三）探测系统

当外加磁场强度（H_0）与射频电磁波的频率（υ）配合好，而满足样品的能级跃迁频率时，则射频电磁波的能量被样品吸收一部分，因而，使射频电磁波的强度减弱，利用探测系统可以测出这些微小的变化。经过检波、放大，就可以把这些变化记

录下来。

（四）记录装置

经过放大的信号，可以用示波器观察，也可以用其他自动记录设备描成曲线，从而得到样品的核磁共振波谱。

二、核磁共振波谱仪的类型

核磁共振波谱仪的种类较多，近年来，脉冲傅里叶 NMR 波谱仪（FT-NMR）取代了连续波 NMR 波谱仪器（W-NMR），它能使不同化学环境的原子核同时共振，并同时获得所有共振核的信息。这种新型的波谱仪具有灵敏度高、测定速度快、使用方便、用途广的优点。

（一）1H-NMR 谱和 13C-NMR 谱

根据产生核磁共振的原子核的不同，可以将核磁共振波谱分为质子核磁共振波谱（1H-NMR 谱）和 13C-核磁共振波谱（13C-NMR 谱）等。由于 1H 同位素的自然丰度最高（99.98%），因此，1H-NMR 的灵敏度最高。但是，由于蛋白质分子中的氢核很多，以至于一维 NMR 谱的谱峰太多，相互重叠，难以分辨。现在，采用多维 NMR 法，可以使上述重叠的谱峰分开，利于分辨。碳原子是蛋白质分子的骨架成分。12C 没有核磁共振，但 13C 有。由于 13C 的自然丰度太低（1.1%），因而 13C-NMR 的灵敏度很低，是 1H-NMR 的灵敏度的 1/6000。近年来，采用脉冲傅里叶 NMR 技术，克服了 13C-NMR 的上述缺点，使 13C-NMR 成为测定蛋白质等生物大分子构象的重要工具。13C 的化学位移为 200ppm 以上，比 1H 的化学位移（10ppm）大得多，因此，13C-NMR 谱的谱峰虽然很多，但很少重叠，可以观察到每个碳核的信号。

（二）一维核磁共振谱和多维核磁共振谱

一维核磁共振波谱（一维 NMR 谱）是吸收峰强度对一个频率变量做的平面图。它是一个频率变量的函数 S（ω）。多维核磁共振波谱（多维 NMR 谱）分为二维核磁共振波谱（2D-NMR 谱）和三维核磁共振波谱（3D-NMR 谱）。2D-NMR 谱是 2 个频率变量的函数 S（ω1、ω2），其吸收峰对两个频率变量作图。2D-NMR 与计算机模拟相结合，已在测定蛋白质或核酸在溶液中的分子构象方面获得成功，使得 2D-NMR 成为分子生物学研究的重要手段。3D-NMR 谱是 3 个频率变量的函数 S（ω1、ω2、ω3）。3D-NMR 谱是在二维谱原理的基础上，直接由二维谱扩展而产生的。

多维 NMR 谱具有一维 NMR 不具有的优点，例如，多维 NMR 谱可以把一维 NMR 谱中的重叠峰在二维或三维方向展开，从而便于对 NMR 谱的解析；多维 NMR 谱不是一维 NMR 谱的简单叠加，它具有更多的结构信息；多维 NMR 谱可以间接检测到一维 NMR 谱中得不到跃迁，如多量子跃迁，实验方法灵活多样。

三、各种型号仪器的性能特点

（一）英国共振仪器有限公司超级 MARAN 系列台式核磁共振（NMR）分析仪

台式超级 MARAN 系列产品为台式 NMR 的先驱，仪器配有各种不同范围的磁体、样品探头、梯度、软件和附件，可满足客户的不同应用需求。交互式操作，实时显示，用户可控制所有参数；样品无损检测，测量精度高、稳定性好；独具多组分定标和测量功能；具有一维到三维的梯度磁场用于扩散测量及成像。其标准应用包括固体脂肪含量检测，快速脂肪测量，合成纤维含油检测，牙膏中的氟含量，燃油中的氢含量，油籽中的含油/水量，多种聚合物参数的测量，石油岩芯分析等。同时可为研究型用户提供水合作用、成像等许多高级功能。

（二）瑞士 BRUKER INCA 一体化核磁共振波谱仪

布鲁克公司的INCA 系列是世界上第一台集成化高场核磁共振化学分析仪。超导磁体、射频系统以及操作计算机全部集成在一个可移动的机柜里，成为统一整体。利用鼠标按钮，通过菜单选择进行控制。

第三节　操 作 使 用

一、操作步骤（以 2D-NMR 法测定蛋白质分子构象为例）

用 2D-NMR 与计算机模拟相结合，测定蛋白质分子在溶液中的空间结构，步骤如下：

1）对溶液中的蛋白质分子作一系列的二维核磁共振实验，得到各种 2D-NMR 谱，如 COSY、NOESY 等。实验分别在水和重水中进行，并选择最适宜的温度、pH 等实验条件。

2）根据 20 种氨基酸的质子自旋体系的特征，从 2D-NMR 谱上确定每一个质子自旋体系属于哪一种氨基酸。

3）按照氨基酸残基序列识别共振峰。首先在 COSY 谱上识别某一氨基酸残基相对应的共振峰，作为序列识别的起始点，然后综合应用 COSY 与 NOESY 谱，沿着多肽链序列，一个一个地识别出各个氨基酸残基的共振峰。

4）测定蛋白质分子中的规则二级结构，并确定其在多肽链上的确切位置。可以采用以下三种方法。

a. 根据 NOESY 谱的交叉峰强度估测 1H-1H 的核间距，然后，由 1H-1H 距离确定多肽链上的规则二级结构。

b. 通过相敏 DQF-COSY 谱，精确测定多肽链上各个氨基酸残基的自旋耦合常数，然后根据各个残基的自旋耦合常数推测多肽链上的规则二级结构。

c. 在重水中作 NMR，测定酰胺质子交换速率（Km），以 Km 对氨基酸残基序列作图。由此确定多肽链上的规则二级结构。

5）两个核之间奥氏效应（NOE）的大小与核间的6次方成反比。根据上述NOE关系得到质子之间距离限制的信息，将此信息和规则二级结构构件以及其他NMR数据，按特定的程序输入计算机，运用距离几何学构建蛋白质分子三维结构的粗模型。

6）用能量优化法或分子动力学方法，对上述模型进行结构修正。至此，完成了蛋白质分子三维结构的测定。

二、常见故障排除

核磁共振仪的常见故障为操作台电源故障。

1. 故障现象

在仪器正常工作时，有时在HHD、BSV单元内的继电器发出断续声响，SCM单元的蜂鸣器也有声响。这时脉冲停发，整个谱仪处于混乱状态。如将整机关机，有时能恢复正常，有时则要多次关、开机才能正常工作。此故障出现频率无规律。

2. 故障分析与排除

发生故障时，根据维护要求只能立即关机，所以一时难以检测。若多次重拷软件及构型无效，可确定此故障不是软件造成，可能是由电源引起。观察故障发生时市电与谱仪之间的稳压电源是否时有异常声响。若换了稳压电源后故障照旧则可断定谱仪内部的直流电源有问题。但谱仪内直流电源众多，而且一个单元内的电源有的是自己产生的，有的是从别的单元来的，还有的两者兼而有之，所以不易判断是哪个单元的哪个电源出了问题。从故障的现象来看，引起继电器乱发声响及蜂鸣器声响等，由操作台内的电源引起故障的可能性最大。这是因为有故障现象的单元均用到操作台内的电源。

然而，操作台内的13个电源都没有过流、过压、过热等指示灯，如用一般的方法，则要对这些电源逐一检查，既费时又费力。现介绍一个省时省力而行之有效的方法：利用每个电源有自己对应的电压指示灯的条件，关掉实验室的照明灯，细致观察当故障产生时的各电压指示灯的亮度变化，如果电压指示灯亮度变暗、不稳或有闪烁，则基本可判定对应电源有问题。关掉室内照明灯，有助于直接观察电压指示灯的细微变化。

第四节　应用与发展

一、高效液相-核磁共振仪联用技术及微量探头技术在天然产物分析中的应用

通过运用高效液相-核磁共振仪联用（HPLC-NMR）技术及微量探头技术对天然产物混合物进行分析，证实了高效液相-核磁共振联用技术及微量探头技术在天然产物分析中的优势，即高效、快速、微量。二者结合使用，使得用NMR技术分析天然产物混合物变得切实可行。

HPLC-NMR技术的研究开始于1978年，当时仪器可采用停止流动模式，随即在

第 2 年，连续流动模式打通，从此以后，随着仪器设计、磁场强度、流动探头等方面研制水平的提高与改进，以及有效的压制溶剂峰的脉冲序列的建立，使得这项技术现在已广泛应用到实际工作中。在 HPLC-NMR 联用技术中，HPLC 提供了强有力的分离手段，NMR 提供了化合物结构的大量信息，如化合物的结构特征、立体化学信息等。

虽然 HPLC 有无可比拟的分离效果，但由于 HPLC-NMR 技术所提供的结构信息仅限于以 1H 作为发射道的各类谱，而不能提供有 13C 的信息，从而大大地限制了其在未知物结构分析中的应用。随着微量探头的应用，打破了这一局限。微量探头与 HPLC-NMR 技术结合使用，微量探头实验所能提供的完整信息，使得 HPLC-NMR 技术如虎添翼。

二、在蛋白质分子构象方面的应用

到目前为止，在测定蛋白质分子构象方面，2D-NMR 法虽然在精度上还不如 X 射线衍射结构分析法，但是它有很多优点却是 X 射线衍射结构分析法难以比拟的。例如，X 射线衍射结构分析法常常会破坏蛋白质分子的构象，而 NMR 法不破坏；X 射线衍射结构分析法只能测定晶体蛋白质的分子构象，而 NMR 法能够测定溶液中的蛋白质分子构象；X 射线衍射结构分析法只能测定蛋白质分子的静态构象或构象变化的始态和终态，而 NMR 法能够测定蛋白质分子的构象变化过程。

多维 NMR 仪在蛋白质方面有着广泛的用途，测定溶液中蛋白质分子构象；研究各种因子（如温度、pH、变性剂等）对蛋白质分子构象的影响；研究底物、产物、抑制剂、辅基、效应物与酶分子构象的相互作用，以获得活性中心或结合部位的结构信息；研究相同或不同蛋白质分子之间的相互作用以及蛋白质与核酸分子之间的相互作用；研究蛋白质分子的构象动力学。

多维 NMR 仪在生物化学方面有越来越广泛的应用，涉及物质代谢、动力学、热力学、生物膜结构与功能、生物大分子结构与功能以及生物分子相互作用等各个方面。

主要参考文献

吕玉光，刘翠娟. 2003. 大型仪器核磁共振仪和电子自旋共振仪使用中常见问题. 现代仪器，(5)：54～55

陶慰孙，李惟，姜涌明. 1995. 蛋白质分子基础. 北京：高等教育出版社. 268～274

张玉良. 1996. AM-300 核磁共振仪操作台电源故障排除. 分析测试仪器通讯，(4)：244～245

第九篇　生化仪器与计算机技术

在20世纪70年代初期，随着大规模集成电路制造技术的发展，人类发明了微处理器芯片。几年之后，美国便开始出售配备有微型计算机的分析仪器，如HP5830A色谱仪。从此，仪器在经历了指针式、数字式等发展阶段后，进入了智能化的发展时期。现阶段智能化仪器以自动选择量程、增益的自动切换、自动校正零点漂移、提高信噪比、测量数据的自动和实时处理与分析、自诊断与容错技术以及测量过程的自动化和实时控制等为主要特点。

未来的仪器应该更好地满足生产和用户的需要，具备高智能化、高性能价格比、高可靠性、使用方便等优点。而引入人工智能、人机工程、软件工程等诸多领域成熟的理论和技术，是达到这些目标的必由之路。计算机为仪器智能化的不断发展提供了坚实的基础，在智能化仪器的设计中应该充分利用人工智能等许多信息和自动化领域的新成果和新技术，使仪器走向更高层次的智能化。

第三十六章　计算机与智能仪器

第一节　智能仪器

一、定　　义

所谓智能仪器是用来形容新的一代测量仪器。这类仪器仪表中含有微处理器、单片计算机或体积很小的微型机，有时也称为内含微处理器的仪器或基于微型机的仪器。目前，智能仪器已广泛应用于工业企业和科研单位中。

二、特　　点

智能仪器的定义表明，当前的智能仪器是一类微计算机化的测量仪器。具有以下两个特点。

（一）智能仪器的基本组成具有典型的计算机结构

在物理结构上，微型计算机内含于测量仪器。微处理器及其支持部件是整个测试电路的一个组成部分；但是，从计算机的观点来看，测试电路与键盘、通用仪器总线（general purpose instrumentation bus，GPIB）、接口（IEC-625，IEEE-488，标准接口）、显示器等部件一样，仅是计算机的一种外围设备。

显然，这是典型的计算机结构，与一般计算机的差别在于它多了一个“专用的外围设备”——测试电路。同时，差别还在于它与外界的通信通常都通过 GPIB 接口进行。既然智能仪器具有计算机结构，因此，它的工作和计算机相近，而与传统的测量仪器差别较大。微处理器是整个智能仪器的核心，固化在只读存储器内的程序是仪器的“灵魂”。系统采用总线结构，所有外围设备（包括测试电路）和存储器都挂在总线上，微处理器按地址对它们进行访问。微处理器接收来自键盘或 GPIB 接口命令，解释并执行这些命令，诸如发出一个控制信号到某个电路或者进行某种数据处理等。既然测试电路是微型计算机的外围设备之一，因而，在硬件上它们之间必然有某种形式的接口。从简单的三态门、译码器、A/D 和 D 从转换器到程控接口等。微处理器通过接口发出各种控制信息绘测试电路，以规定功能、启动测量、改变工作方式等，通过查询测试电路的输入信息或向微处理器提出的中断请求，使微处理器及时了解测试电路的工作情况。当测试电路完成一次测量后，微处理器读取测量数据，进行必要的加工、计算、变换等处理，最后以各种方式输出，如送到显示器显示、打印机打印或送给系统的主控制器等。

（二）本地和遥控（远地）两种工作方式

智能仪器据有本地和遥控（远地）两种工作方式。

在本地工作方式时，用户按面板上的键盘向仪器发布各种命令，指示仪器完成各种

功能。仪器的控制作用由内含的微处理器统一指挥和操纵。

在遥控工作方式时，用户通过外部的微型机来指挥控制仪器，外部微型机通过接口总线 GPIB 向仪表发送命令和数据。仪器根据这些送来的命令完成各种功能。这时，面板的键盘将不起作用。在有多台仪器的大测试系统中，这种方式十分有用，便于构成自动检测系统。系统连接的仪器可多达十几台，整个传输范围可达近 30m。

三、智能化对生化仪器发展的影响

随着计算机技术和智能仪器相关研究的迅猛发展，智能化对生化仪器的改进和发展起到了极大的促进作用，智能化对生化仪器发展的影响主要表现在以下几个方面：① 提高了仪器的测量精度，通过智能计算机的控制，可以使生化仪器达到远高于以往人为手工操作的测量精度；② 提高了生化仪器的自动校准能力；③ 使生化仪器具有了修正误差的能力；④ 能够进行间接测量；⑤ 具有自治自诊断的能力；⑥ 能够实现复杂的控制功能；⑦ 允许灵活地改变仪器的功能；⑧ 便于通过标准总线组成一个多仪器的复杂控制系统；⑨ 智能仪器可实现专家系统技术。

第二节　计算机技术对生物化学与分子生物学仪器与设备的影响

一、生物化学与分子生物学仪器智能化的发展进程

计算机技术给生物学仪器带来了革命，以分析仪器的发展为例我们可以看出计算机技术已经在生物学仪器中扮演着至关重要的角色，使生物学仪器的面貌大为改观。

分析仪器的发展史并不很长，大约只有 70 多年。从 20 世纪 20 年代开始，最早的仪器是较简单的设备如天平、滴管等。分析工作者用目视和手动的方法一点一点地取得数据，然后做记录，介入了每一个分析步骤。

第二阶段是 1930～1960 年间，人们使用特定的传感器把要测定的物理或化学性质转化为电信号，然后用电子线路使电信号再转化为数据，如当时的紫外及红外光谱、极谱仪等，分析工作者用各种电钮及各种开关来使上述电信号转化到表头或记录器。当时也出现了一些数字显示的仪器如 Nixie 管，它们的主要贡献是使模量变成了数字，因而为进入第二代的分析仪器开阔了视野。

到 1960 年以后微计算机的应用，也就形成了第三代分析仪。这些计算机与已有的分析仪器相连，用来处理数据。有时可以用计算机的程序输入简单的指令，并由计算机驱使分析仪器自动处于最佳操作条件，并监控输出的数据，但脱离了计算机，当时的分析仪器仍可以独立工作。一般要求工作者必须对计算机十分熟悉才能使用这类系统。

微处理机芯片的制造成功，进一步促进了第四代分析仪器的发展。例如，20 世纪 70 年代后期惠普公司推出的 8450A 型阵列二极管的可见紫外光谱仪等。微处理机在该仪器书已是一个不可分割的部件，直接由分析工作者输入指令，同时控制仪器并处理数据，以不同方式输出结果，也可以对仪器的各部件进行诊断。数据处理速度及内存量的增加使数据的接收及处理非常快速。新的技术如傅里叶变换的红外光谱仪及核磁共振仪的相继出现都是用计算机直接操作并处理结果的。有时可以仅用一台计算机同时控制几台分析系统，

键盘及显示屏代替了控制钮及数据显示器等。某一特定分析方法的各种程序及参数都可以预先储存在仪器内，再由分析者随时调出，此时分析工作者则大量依赖于仪器制造商的现成软件，操作显得很简单，但分析工作者也就离仪器各部件更加遥远。

第五代分析仪器始于20世纪90年代，此时计算机的性能价格比进一步改进，因而有可能采用功能十分完善的个人计算机来控制第四代分析仪器。分析工作中必不可少的制样、进样过程都可以自动进行。已有一些仪器制造商可以提供工作站，其中包括各种制样技术，如稀释、过滤、抽提等模式，样品在不同设备中的移动可以用诸如流动注射或机器人进行操作。目前对于环境样品的分析已有这类标准模式全自动动仪器出售。高效的图像处理可以使工作及监控分析过程自动进行，并为之提供报告及结果的储存。

二、计算机技术对生化仪器与设备的影响

计算机的发展促使微电子技术的进步，而微电子技术的迅速发展又使得计算机的发展取得长足的进步。微电子技术的进步对仪器产生了越来越明显的影响。芯片集成度数量的飞速增加，必然导致集成电路功能的质变，也导致新型电子器件的问世，从而极大地推动仪器器件的发展。

（一）计算机及其技术对分析仪器器件的改进

1. 专用集成电路

近10年来，专用集成电路产品无论在集成度、价格、产量还是产值方面均取得了飞速进展。

2. 单片数字信号处理器芯片

长期以来，数字信号处理照所要求的大计算量一直妨碍着信号处理这一学科的发展与应用。新型的单片数字信号处理器（DSP）将通用数字计算机与高速信号处理功能结合起来，专门针对高速或计算密集的应用。

（二）计算机对仪器数据处理能力的提高

在计算机控制下现代分析仪器以惊人的速度完成采集、归整、变换和处理大量的数据，给现代生物仪器的数据分析带来一场新的革命。

（三）计算机对仪器数字图像处理功能的发展

图像处理和现实系统已成为现代生化不可缺少的一部分。以微探针为例，由电子、X射线或离子束照射样品，观察由吸收、透射、散射、能量损失、光电照射、阴极射线、荧光、离子散裂、表面声振与电流拾取等信号构成的图像，可以获得远比通常处理手段更多的样品信息。图像处理技术与扫描电镜的结合可以使扫描电镜取得优越的空间分辨率与极高的对比度，这是通常光学显微镜提供不了的。采用各种检测器，可以获得对应于不同样品特征的高质量图像。扫描电镜配合X光能谱可完成表面成像分析。

计算机视觉是图像处理技术近期最活跃的研究领域之一，即对其图像或其序列提取信息，对被观察景象的一维图像做出描述、分析、解释和理解，也可从一维图像束分析解释

二维或多维立体图像。总而言之，采用图像处理技术的现代分析仪器不仅可对各种样品进行高质量的分析与处理，而且可在地质、材料、金相、生物、医学、环保等众多领域对物体基本的灰度等级或彩色信息反映的形态与密度结构做出实质性的评价与定量分析。

（四）计算机与生化仪器联用及自动化程度的提高

当前生化仪器配用计算机可以很好地完成数据测量、显示与操作控制的任务。联用仪器的发展应运而生，即采用接口与计算机把两种或多种功能互相补充的仪器联为一体。

仪器自动化的进一步发展，不仅仅只是要求自动操作仪器功能的进一步扩充，而且将包括发展管理实验室的能力，如与自动进样器相结合的实验程序的开发，人机友好交互能力的增强，仪器操作者的教授培训，寻找测量装置中的模型，测试数据自动存档保存等方面。这些工作最终将导致实验室信息管理系统的出现。

应该指出的是，机器人已经开始在生化中得到了应用，借助机器人，从收到样品、记录、贴标签、安排实验步骤做好准备，然后由实验仪器进行生化，所有的数据与结论均由计算机来进行管理。

（五）计算机使生化仪器更趋智能化

智能化是当代生化仪器及其专用计算机的重要发展方向之一。从信息科学的角度来看，信息技术的发展可分为 4 个层次，即数码化、自动化、最优化与智能化。数码化是指仅仅把客观的物理概念加以数码化，即以二进制数码描述之，以便于存储与处理，这是最低的一层。自动化是按固定的规则进行重复性处理，达到预期的目的。最优化是按某种预定指标取得最优的解。计算机与生化仪器的成功结合是取得重大成果并相对比较成熟的领域。智能化是信息技术的最高层次，它应包括理解、推理、判断与生化等系列功能，是数值、逻辑与知识的综合分析结果。人们通常称谓的“智能分析仪器”与上述智能化的要求尚有相当距离。今天的智能生化仪器仍处于仪器智能化的低级阶段，它只是把计算机技术与传统的生化仪器结合起来，它仅能适应被测参数的变化、自动补偿、自动选择进程、自动校准、自寻故障、自动进行有限的数据处理，使生化过程由手工操作向自动化方向过渡。显然、计算机与大容量的存储器已成为智能仪器的核心。今天的智能生化仪器更精确地应称为“计算机化仪器”。

目前，随着化学分析多机联用技术的进展，运用人工智能技术建立各种化学谱图的识别与解释的专家系统已成为现代分析仪器智能化研究的热点之一。例如，将现有的计算机辅助红外光谱数据库检索系统发展为谱图辨识智能分析系统，即建立一个能识别、解释红外光谱、质谱等谱图的专家系统，这些方面的工作以及部分成果已引起国内外分析仪器专家的高度重视。目前称为“智能化的生化仪器”一般包括专家咨询系统、条件优化系统、样品测定系统，以及数据库和决策系统。

第三节　各种计算机技术在智能仪器中的应用

一、单片机在智能仪器中的应用研究

单片机又称单片微控制器或者嵌入式微控制器，它不是完成某一个逻辑功能的芯

片，而是把一个逻辑功能的芯片集成到一个芯片上。它体积小，质量轻，价格便宜。它的使用领域非常广泛，如智能仪表、实时工程、通讯设备、导航系统、家用电器等。各种产品一旦用上了单片机，就能起到使产品升级换代的功效，常在产品名称前冠以形容词——“智能型”。现代单片机技术的进步体现在内部结构的进步，功耗、封装及电源电压的进步以及工艺上的进步。

在智能仪器仪表中，选择单片机作为仪器中的微处理器，也就是将 CPU、RAM、EPROM、终端系统、I/O 接口集成在一块芯片上，构成单片计算机。这样仪器不再是简单的获取数据，而是具有一定的计算功能，可以对数据进行某些处理。单片机以其体积小，可靠性高，抗干扰能力强而广泛应用于仪器设计中。

单片机在微型智能仪器中使用的硬件原理框图如 36-1 所示。

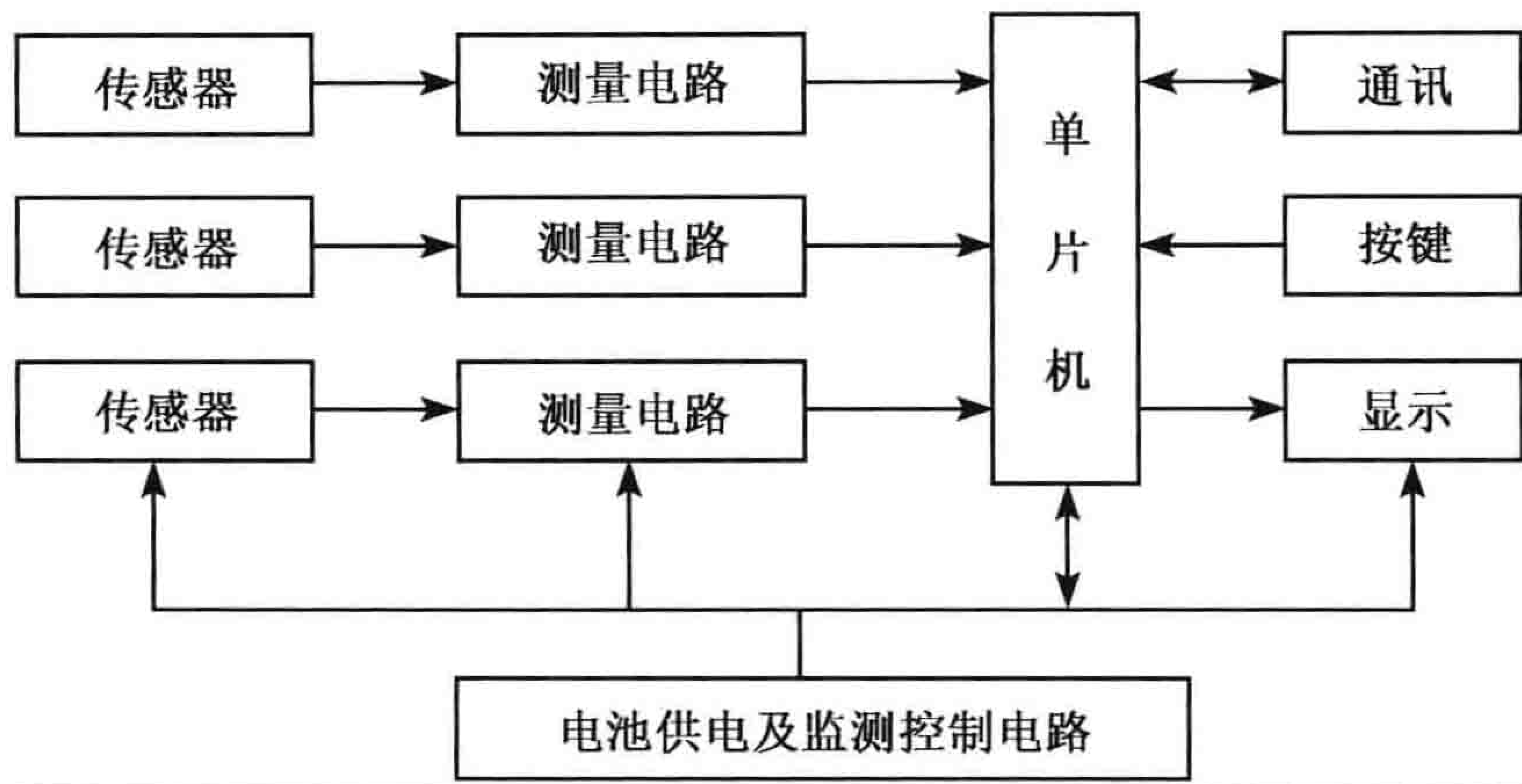


图 36-1　单片机在微型智能仪器中使用的硬件原理框图

软件主要由系统初始化及自检、测量、传感器调整及标准件校准、标准件及公差值设置、通讯等模块组成，其软件流程简图如图 36-2 所示。

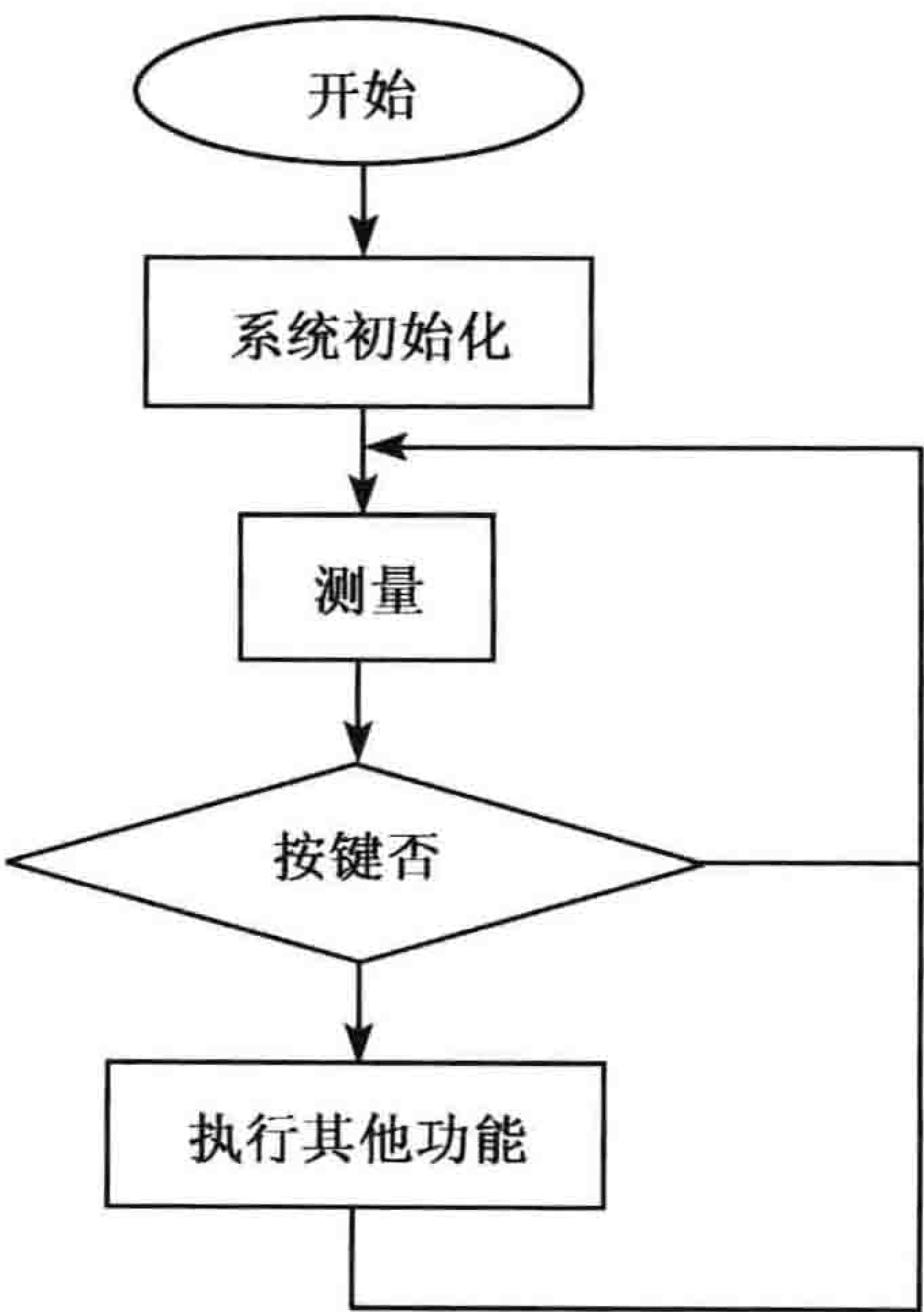


图 36-2　软件流程简图

二、嵌入式 PC 在智能仪器中的应用

嵌入式系统有狭义和广义两种不同的概念，在早期狭义的概念中，所指的是把单片机装入有某种功能并有独立形态的系统中作为智能控制核心；在广义的概念中，如果把某种职能部件组合在系统中，成为系统的一部分，那么这个系统就可以称为嵌入式系统。常用的定义为以应用为中心、以计算机技术为基础、软件硬件可裁剪、适应应用系统对功能、可靠性、成本、体积、功耗严格要求的专用计算机系统。嵌入式系统是将先进的计算机技术、半导体技术和电子技术和各个行业的具体应用相结合后的产物，这点就决定了它必然是一个技术密集、资金密集、高度分散、不断创新的知识集成系统。嵌入式系统通常由硬件和软件两部分组成。简单的嵌入式系统由微控制器或单片机及嵌入式软件组成。嵌入系统与通用计算机系统相比有 5 个明显的

特征：专用性、可封装性、外来性、实时性和可靠性。专用性是指嵌入式计算机系统用于特定设备完成特定任务。嵌入式系统的硬件和软件都必须是高效率的设计，量体裁衣、去除冗余，力争在同样的硅片面积上实现更高的性能，这样才能在具体竞争中更具有竞争力。

嵌入式计算机可以分成以下几类。

（一）嵌入式微处理器

嵌入式微处理器（embedded microprocessor）的基础是通用计算机中的CPU。在应用中，将微处理器装配在专门设计的电路板上，只保留和嵌入式应用有关的母板功能，这样可以大幅度减小系统体积和功耗。为了满足嵌入式应用的特殊要求，嵌入式微处理器虽然在功能上和标准微处理器基本是一样的，但在工作温度、抗电磁干扰、可靠性等方面一般都做了各种增强。

（二）嵌入式微控制器

嵌入式微控制器（microcontroller unit，MCU）又称单片机，一般以某一种微处理器内核为核心，芯片内部集成ROMPEPROM、RAM、总线、总线逻辑、定时P计数器、WatchDog、IPO、串行口、脉宽调制输出、APD、DPA、Flash RAM、E2PROM等各种必要功能和外设。为适应不同的应用需求，一般一个系列的单片机具有多种衍生产品，每种衍生产品的处理器内核都是一样的，不同的是存储器和外设的配置及封装。这样可以使单片机最大限度地和应用需求相匹配，功能不多不少，从而减少功耗和成本。和嵌入式微处理器相比，微控制器的最大特点是单片化，体积大大减小，从而使功耗和成本下降、可靠性提高。

（三）嵌入式DSP处理器

嵌入式DSP处理器（embedded digital signal processor）对系统结构和指令进行了特殊设计，使其适合于执行DSP算法，编译效率较高，指令执行速度也较高。在数字滤波、FFT、谱分析等方面DSP算法正在大量进入嵌入式领域，DSP应用正从在通用单片机中以普通指令实现DSP功能，过渡到采用嵌入式DSP处理器。

（四）嵌入式片上系统

随着EDI的推广和VLSI设计的普及及半导体工艺的迅速发展，在一个硅片上实现一个更为复杂的系统的时代已来临，这就是嵌入式片上系统（system on chip，SOC）。各种通用处理器内核将作为SOC设计公司的标准库，和许多其他嵌入式系统外设一样，成为VLSI设计中一种标准的器件，用标准的VHDL等语言描述存储在器件库中。用户只需定义出其整个应用系统，仿真通过后就可以将设计图交给半导体工厂制作样品。这样除个别无法集成的器件以外，整个嵌入式系统大部分均可集成到一块或几块芯片中去，应用系统电路板将变得很简洁，对于减小体积和功耗、提高可靠性非常有利。工业嵌入式系统的突出特点是：体积小、量大、技术高、可靠、软硬件一体、各种技术相融合。

许多仪器都要求高密度，高可靠性及体积小、便于携带，嵌入式系统则能够更好地满足这个需求。嵌入式系统以嵌入方式与外围电路组成层叠式电路结构，此结构易于在小的空间内安装。

三、蓝牙技术在仪器中的应用

所谓蓝牙（bluetooth）技术实际上是一种短距离无线电技术。利用蓝牙技术，能够有效地简化掌上电脑、笔记本电脑和移动电话手机等移动通信终端设备之间的通信，也能够成功地简化以上这些设备与因特网之间的通信，从而使这些现代通信设备与因特网之间的数据传输变得更加迅速高效，为无线通信拓宽道路。

蓝牙作为一种近距离无线通信技术的标准，是由爱立信、IBM、英特尔、诺基亚、东芝 5 家公司于 1998 年 5 月联合制定的。其主要在于实现最高数据传输速率为 1Mb/s (有效传输速率为 721kb/s)，以时分方式进行全双工通信，通信距离为 10m 左右，配置功率放大器可以使通信距离进一步增加。从蓝牙技术的出现到现在，得到了几乎全球所有涉足通信技术的著名厂商的全面支持。其提供的低成本、低功耗的无线接入方式，被认为是近年来无线数据通信领域中的重大进展之一。

通过与嵌入式系统、因特网、局域网技术相结合，蓝牙技术因其种种优点，在工控、智能仪器仪表等行业中，也将得到广泛地应用。

（一）蓝牙技术的特点和优势

蓝牙技术的主要特点有：其产品采用的是跳频技术，能够抗信号衰弱；采用快跳频和短分组技术，能够有效地减少同频干扰，提高通信的安全性；采用前向纠错编码技术，以便在远距离通信时减少随机噪声的干扰；采用 2.4GHz 的 ISM（即工业、科学、医学）频段，以省去申请专用许可证的麻烦；采用 FM 调制方式，使设备变得更为简单可靠；蓝牙技术产品一个跳频频率发送一个同步分组，每组一个分组占用一个时隙，也可以增至 5 个时隙；蓝牙技术支持一个异步数据通道，或者 3 个并发的同步语音通道或者一个同时传送异步数据和同步语音的通道。蓝牙的每一个话音通道支持 64kb/s 的同步话音，异步通道支持的最大速率为 721kb/s、反向应答速率为 57.6kb/s 的非对称连接，或者 432.6kb/s 的对称连接。

蓝牙技术的性能优点有：可以随时随地用无线接口来代替有线电缆连接；具有很强的移植性，可应用于多种通信场合，如 WAP、GSM、DECT 等；引入身份识别后可以灵活实现漫游，功耗低，对人体危害小。

（二）蓝牙技术的组成部分

1）无线射频单元。

2）连接控制单元。

连接控制单元（即基带）描述了数字信号处理的硬件部分——链路控制器，它实现了基带协议和其他的底层连接规程。

3）链路管理。

链路管理器（LM）软件实现链路的建立、认证及链路配置等。

4）软件结构。

蓝牙设备应具有互操作性，对于某些设备，从无线电兼容模块和空中接口直到应用层协议和对象交换格式，都要实现互操作性。

（三）蓝牙技术与其他无线连接技术的对比

近年来，随着各种无线通信技术的快速发展，出现了许多无线通信技术标准。其中用于实现局域无线组网的主要有以下 5 种技术：蓝牙、IEEE 802.11、HomeRF、IrDA 和 UWB。它们的无线连接方案的对比如表 36-1 所示。IEEE 802.11 是一种应用于高端的 WLAN 技术。在市场上主要应用于企业无线网络的连接。HomeRF 是专门为一般家庭用户设计的无线局域网技术。IrDA 技术是目前无线连接市场份额最大的，已经安装了至少 5000 万个单元。它采用红外线作为通信媒介，支持各种速率的点到点的语音和数据业务。超宽带无线电（ultra wideband radio，UWB）是一种新技术。其性质类似于雷达，在很宽的频段内传短脉冲，将信息调制到脉冲的时间和频率上。蓝牙技术是一项全球统一的无线数据和语音传输的开放式标准，具有连接的普遍性和很强的扩展性。

表 36-1　无线连接方案的对比

	蓝牙	802.11	Home RF	IrDA	UWB
有效距离/m	10～100	100	覆盖典型家庭	1	5
传输速度/MPa	1	11	2	16	400
价格	较低	昂贵	适中	很低廉	昂贵

尽管红外技术距离超短，并存在角度，不可穿越障碍物，但是目前大型设备具备该接口，笔记本电脑仍使用红外接口技术作为标准配置。而且红外技术最新标准定义的速率已经达到 4Mb/s，所以很多人认为蓝牙技术还不可能在短时间内代替红外技术。然而蓝牙技术产品与因特网之间的通信，使得家庭和办公室的设备不需要电缆也能够实现互通互联，大大提高办公和通信效率。因此，蓝牙将成为无线通信领域的新宠，将为广大用户提供极大的方便而受到青睐。

红外技术与蓝牙技术的比较见表 36-2。

表 36-2　红外与蓝牙的参数对比

	红外技术	蓝牙技术
技术	红外光（850nm）	射频技术（2.4GHz）
方向性	视角±15°	全方位
传输距离	1m	10～100m
传输速度	高速率（0.1～16Mb/s）	721kb/s
连接方式	点对点	点对多点
价格	低于 5 美元	20～25 美元
市场	超过 1 亿 5 千万的设备安装了红外接口，年增长率约为 40%	刚开始进入市场
误码率	10E-8	10E-3
安全性	无需加密	需加密

主要参考文献

陈建铎，李芳. 1998. 智能化与智能化仪器仪表. 现代电子技术，(2)：39～41
刘征宇. 2005. AT89C51 单片机在医疗仪器中的应用. 福建电脑，(1)：73～74
汪仁煌，汪锐. 2001. 智能仪器的一种多单片机信息处理系统. 计量技术，(2)：5～7
王少荣，刘沛，程时杰等. 2000. 单片机与 MODEM 接口技术及其在智能仪器中的应用研究. 工业控制计算机，13 (2)：45～46
韦哲，程自峰. 2005. 蓝牙技术及其在医学仪器中的应用. 医疗装备，(3)：1～3
薛伯韬. 2000. 红外技术与蓝牙技术的对比. 电子产品世界，(8)：6
祝世平. 1996. 智能化仪器仪表的现状与发展. 中国仪器仪表，(6)：4～6

[General Information]
书名=现代生物化学与分子生物学仪器与设备
作者=雷东锋编著
页数=353
SS号=14076036
DX号=
出版日期=2016.06
出版社=科学出版社